

08 SEP 2005

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

54350

021006



(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



PCT

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. September 2004 (23.09.2004)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/081217 A2**

BEST AVAILABLE COPY

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82,  
C07K 14/415, C12N 15/29, A01H 5/00

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002436

(22) Internationales Anmeldedatum:  
10. März 2004 (10.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 11 118.2 12. März 2003 (12.03.2003) DE

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056  
Ludwigshafen (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRANK, Markus  
[DE/DE]; Rheindammstrasse 30, 68163 Mannheim (DE).  
KOGEL, Karl-Heinz [DE/DE]; Berggartenstrasse 7,  
35457 Lollar (DE). HÜCKELHOVEN, Ralph [DE/DE];  
Glaubrechtstr. 12, 35392 Giessen (DE).

(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(54) Title: METHOD FOR INCREASING RESISTANCE AGAINST STRESS FACTORS IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER RESISTENZ GEGEN STRESSFAKTOREN IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing or increasing resistance against at least one biotic or abiotic stress factor in plants, preferably against plant pathogens, by increasing expression of at least one Bax inhibitor 1 (BI1) protein in at least one plant tissue, under the proviso that expression in leaf epidermis remains substantially unmodified. The invention relates further to recombinant expression cassettes and vectors that comprise a nucleic acid sequence coding for the BI protein under the control of a tissue-specific promoter, said promoter having substantially no activity in leaf epidermis. The invention further relates to recombinant plants that are transformed with said expression cassettes or vectors, to cultures, parts or recombinant propagation material derived thereof, and to the use of the same for producing food, feeding stuff, seeds, pharmaceuticals or fine chemicals.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Massgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BIProtein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

WO 2004/081217 A2

STK

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen Stressfaktoren in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1

10

(BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines

15

gewebespezifischen Promoters umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die

20

Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

25

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten

30

in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfraß in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37)

35

oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

40

Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei

45

verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogener Botenstoffe wie Jasmonat (JA) oder

Salizylsäure (SA) vermittelt werden (Ward et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknas et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-5-7-thiocarbonsäure-S-methylester (BTH; Bion<sup>®</sup>) (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.

10

In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte, rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Mehltäusolate (Büsches R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790).

15

Das Mlo-Gen ist beschrieben (Büsches R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Mlo-Homologe aus anderen Getreidearten wurden isoliert. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Nachteilig ist, dass Mlo-defiziente Pflanzen auch in Abwesenheit eines Pathogens den o.g. 20 Abwehrmechanismus initiieren, was sich in einem spontanen Absterben von Blattzellen äußert (Wolter M et al. (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Dadurch erleiden mlo-resistente Pflanzen eine Ertragseinbuße von ca. 5% (Jörgensen JH (1992) Euphytica 63: 141-152). Das spontane Absterben der Blattzellen bedingt 25 ferner eine nachteilige Hypersuszeptibilität gegen nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) oder *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133).

30

35 Faktoren die einen der mlo-Resistenz vergleichbaren Effekt gegen nekrotrophe Pilze vermitteln, konnten bislang nicht identifiziert werden. Dies mag an dem besonderen Infektionsmechanismus der nekrotrophen Pilze liegen: Anstelle einer Appressorien-vermittelten Penetration infundieren sie zunächst die pflanzliche Wirtszelle mit Mykotoxinen und Enzymen, was zu einem Absterben der Zelle führt. Erst danach wird die Zelle penetriert (Shirasu K and Schulze-Lefert P (2000) Plant Mol Biol 44:371-385). Ähnliche Infektionsstrategien verfolgen 40

bakterielle Pathogene wie *Erwinia carotovora* (Whitehead NA et al. (2002) Antonie van Leeuwenhoek 81: 223-231). Eine Penetrationsresistenz mit Hilfe von Papillenbildung etc. stellt hier keine effiziente Abwehrstrategie dar.

5 Apoptose, auch als programmiertter Zelltod bezeichnet, ist ein essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase und steht damit der Zellteilung als negativ regulierender Mechanismus gegenüber. Im vielzelligen Organismus  
10 10 ist die Apoptose ein natürlicher Bestandteil der Ontogenese und u.a. an der Entwicklung der Organe und der Beseitigung von gealterten, infizierten oder mutierten Zellen beteiligt. Durch die Apoptose wird eine effiziente Elimination von unerwünschten Zellen erreicht. Eine Störung oder Inhibition der Apoptose trägt  
15 15 zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen bei, unter anderem zur Karzinogenese. Die Haupteffektoren der Apoptose sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die sogenannten Caspasen. Ihre Aktivierung kann durch mindestens zwei Apoptose-Signalwege stattfinden: Zum einen durch die Aktivierung der TNF-  
20 20 (Tumor Necrosis Factor) Rezeptorfamilie, zum anderen spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle. Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges wird durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Diese Proteininfamilie besteht aus anti-apoptotischen sowie pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. Bax. Im  
25 25 Falle eines apoptotischen Stimulus findet eine allosterische Konformationsänderung des Bax-Proteins statt, welche zur Verankerung des Proteins in der mitochondrialen Außenmembran und seiner Oligomerisierung führt. Durch diese Oligomere werden pro-apoptotischen Moleküle aus den Mitochondrien ins Zytosol  
30 30 freigesetzt, die eine apoptotische Signalkaskade und letztlich die Degradierung spezifischer zellulärer Substrate bedingen, was den Zelltod zur Folge hat. Der Bax Inhibitor-1 BI1 wurde über seine Eigenschaft isoliert, die pro-apoptotische Wirkung von BAX zu inhibieren (Xu Q & Reed JC (1998) Mol Cell 1(3): 337-346).  
35 35 BI1 stellt ein hochkonserviertes Protein dar. Es findet sich überwiegend als integraler Bestandteil intrazellulärer Membranen. BI1 interagiert mit bcl-2 und bcl-xl. Überexpression von BI1 in Säugetierzellen unterdrückt die pro-apoptotische Wirkung von BAX, Etoposid und Staurosporin, aber nicht von Fas-Antigen (Roth W and Reed JC (2002) Nat Med 8: 216-218). Die Inhibition von BI1 durch antisense-RNA hingegen induziert Apoptose (Xu Q & Reed JC (1998) Mol Cell 1(3):337-346). Die ersten pflanzlichen Homologen von BI1 wurden aus Reis und Arabidopsis isoliert (Kawai et al. (1999) FEBS Lett 464:143-147);

Sanchez et al (2000) Plant J 21:393-399). Diese pflanzlichen Proteine supprimieren BAX-induzierten Zelltod in Hefe. Die Aminosäure-Sequenzhomologie zu menschlichem BI1 beträgt ca. 45%. Das Arabidopsis-Homolog AtBI1 vermag in rekombinanten Pflanzen die pro-apoptotische Wirkung von BAX aus Maus zu supprimieren (Kawai-Yamada et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(21):12295-12300). Das Reis (*Oryza sativa*) BI1-Homolog OsBI1 wird in allen pflanzlichen Geweben exprimiert (Kawai et al. (1999) FEBS Lett 464: 143-147). Beschrieben sind ferner BI1-Gene aus Gerste (*Hordeum vulgare*; GenBank Acc.-No.: AJ290421), Reis (GenBank Acc.-No.: AB025926), Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: AB025927), Tabak (GenBank Acc.-No.: AF390556) und Raps (GenBank Acc.-No.: AF390555, Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386). Die Expression von BI1 in Gerste wird infolge einer Infektion mit Mehltau hochreguliert (Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47(6):739-748).

WO 00/26391 beschreibt die Überexpression der anti-apoptotischen Gene Ced-9 aus *C. elegans*, sflAP aus *Spodoptera frugiperda*, bcl-2 aus Mensch sowie bcl-xl aus Huhn in Pflanzen zur Erhöhung der Resistenz gegen nekrotrophe bzw. hemibiotrophe Pilze. Pflanzliche BI1-Homologe werden nicht offenbart. Die Expression erfolgt unter Kontrolle konstitutiver Promotoren. Beschrieben ist ferner die Expression eines BI1 Proteins aus Arabidopsis unter dem starken konstitutiven 35S CaMV Promotor in Reiszellen und eine dadurch induzierte Resistenz gegen Zelltod induzierende Substanzen aus Magnaporthe grisea (Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).

Üerraschenderweise wurde im Rahmen dieser Erfindung gefunden, dass eine konstitutive Expression eines BI1-Proteins zwar eine Resistenz gegen nekrotrophe Pilze bedingt, jedoch ein Brechen der mlo-vermittelten Resistenz gegen obligat-biotrophen Echten Mehltau (siehe Vergleichsversuch 1) zur Folge hat. Dies stellt den wirtschaftlichen Nutzen der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren in Frage.

Es bestand die Aufgabe, Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr pflanzlicher Pathogene (bevorzugt nekrotropher Pathogene) ermöglichen, ohne eine ggf. bestehende Resistenz gegen andere Pathogene (wie beispielsweise biotrophe Pathogene) zu brechen. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfaßt sind

5

- a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattempidermis im wesentlichen unverändert bleibt oder reduziert wird, und
- 10 b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Ausgangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor besteht oder erhöht ist.

15

Bevorzugt ist der biotische oder abiotische Streßfaktor ein Pathogen, besonders bevorzugt ein Pathogen ausgewählt aus der Gruppe der nekrotrophen und hemibiotrophen Pathogene.

20

Unter der Epidermis versteht der Fachmann das vorherrschende Abschlussgewebe primärer oberirdischer Pflanzenteile, so des Sprosses, der Blätter, Blüten, Früchte und Samen. Nach außen scheiden die Epidermiszellen eine wasserabstoßende Schicht, die 25 Kutikula ab. Die Wurzeln sind von der Rhizodermis umgeben, welche der Epidermis in vieler Hinsicht ähnelt, jedoch auch markante Unterschiede zu ihr aufweist. Die Epidermis entsteht aus der äußersten Schicht des Apikalmeristems. Die Ableitung der Rhizodermis hingegen ist weniger klar. Je nach Art kann sie 30 entwicklungsgeschichtlich entweder der Wurzelhaube oder der primären Rinde zugerechnet werden. Der Epidermis können zahlreiche Funktionen zugeschrieben werden: Sie bietet der Pflanze Schutz vor Austrocknung und regelt die Transpirationsrate. Sie schützt die Pflanze vor den verschiedensten chemischen und 35 physikalischen Fremdeinflüssen sowie vor Tierfraß und Befall durch Parasiten. Sie ist am Gasaustausch, an der Sekretion bestimmter Stoffwechselprodukte und an der Absorption von Wasser beteiligt. In ihr sind Rezeptoren für Licht und mechanische Reize enthalten. Sie wirkt damit als ein Signalwandler zwischen 40 Umwelt und Pflanze. Entsprechend den verschiedenen Funktionen enthält die Epidermis eine Anzahl unterschiedlich differenzierter Zellen. Hinzu kommen artspezifische Varianten und unterschiedliche Organisation der Epidermen in den einzelnen Teilen einer Pflanze. Im wesentlichen besteht sie aus drei Kategorien

von Zellen: den "eigentlichen" Epidermiszellen, den Zellen der Stomata (Spaltöffnungen) und den Trichomen (griech.: Trichoma, Haar), epidermalen Anhangsgebilden verschiedener Form, Struktur und Funktion.

- 5 Die "eigentlichen", d.h., die am wenigsten spezialisierten Epidermiszellen machen die Hauptmasse der Zellen des Abschlussgewebes aus. Sie sind in der Aufsicht entweder polygonal (von platten- oder tafelförmiger Gestalt) oder gestreckt. Die zwischen ihnen ausgebildeten Wände sind vielfach gewellt oder  
10 gebuchtet. Wodurch diese Form während der Entwicklung induziert wird, ist unbekannt, die vorliegenden Hypothesen erklären den Sachverhalt nur unbefriedigend. Gestreckte Epidermiszellen findet man an Organen oder Organteilen, die selbst gestreckt sind, so z.B. an Stengeln, Blattstielen und Blattrippen sowie an  
15 den Blättern der meisten Monokotyledonen. Ober- und Unterseite von Blattspreiten können von unterschiedlich strukturierten Epidermen bedeckt sein wobei sowohl die Form der Zellen, die Dicke der Wände als auch die Verteilung und Zahl spezieller Zellen (Stomata und/oder Trichome) pro Flächeneinheit variieren  
20 kann. Große Variationen findet man auch innerhalb einzelner Familien, z. B. bei den Crassulaceen. Meist ist die Epidermis einschichtig, jedoch sind bei Arten aus mehreren Familien (Moraceae: hier die meisten Ficus-Arten, Piperaceae: Peperomia [Peperonie], Begoniaceae, Malvaceae u.a.) mehrschichtige  
25 wasserspeichernde Epidermen nachgewiesen worden. Epidermiszellen sondern nach außen eine Cutinschicht (Kutikula) ab, die als ein ununterbrochener Film alle epidermalen Oberflächen überzieht. Sie kann entweder glatt oder durch Vorwölbungen, Leisten, Falten und Furchen strukturiert sein. Doch nicht immer beruht eine  
30 durch Betrachtung der Oberfläche sichtbare Faltung der Kutikula auf der Ausbildung von Kutikularleisten. Es gibt durchaus Fälle, wo eine Kutikulafaltung nur der Ausdruck der darunterliegenden Ausstülpungen der Zellwand ist. Epidermale Anhangsgebilde verschiedener Form, Struktur und Funktion werden als Trichome  
35 bezeichnet und hierin ebenfalls unter dem Begriff „Epidermis“ verstanden.. Sie treten als Schutz-, Stütz- und Drüsenhaare in Form von Schuppen, verschiedenen Papillen und bei Wurzeln als absorbierende Haare auf. An ihrer Bildung sind allein Epidermiszellen beteiligt. Oft entsteht ein Trichom aus nur einer solchen  
40 Zelle, manchmal sind an der Entstehung mehrere beteiligt. Ebenfalls umfasst unter dem Begriff „Epidermis“ sind Papillen. Papillen sind Ausstülpungen der Epidermoberfläche. Das Lehrbuchbeispiel hierfür sind die Papillen auf Blütenoberflächen des Stiefmütterchens (*Viola tricolor*) sowie die Blattoberflächen

- vieler Arten im tropischen Regenwald. Sie verleihen der Oberfläche eine samtartige Konsistenz. Einige Zellen von Epidermen können als Wasserspeicher ausgebildet sein. Ein typisches Beispiel stellen die Blasenzellen an Oberflächen
- 5 vieler Mittagsblumenarten und anderer Sukkulanten dar. Bei manchen Pflanzen, z.B. bei der Glockenblume (*Campanula persicifolia*) sind die Außenwände der Epidermis linsenförmig verdickt.
- 10 Die Hauptmasse aller Gewebe bildet das Grundgewebe oder Parenchym. Zu den parenchymatischen Geweben gehört das Mesophyll, das in Blättern in Palisadenparenchym und Schwammparenchym differenziert sein kann.
- 15 Folglich versteht der Fachmann unter Mesophyll ein parenchymatisches Gewebe. Parenchymatische Zellen sind durchweg lebend, meist isodiametrisch, seltener gestreckt. Das Mark der Sprosse, die Speichergewebe der Früchte, Samen, der Wurzel und anderer unterirdischer Organe sind ebenso als Parenchyme zu betrachten
- 20 wie das Mesophyll.
- Das Mesophyll ist in den Blättern der meisten Farne und Phanerogamen, besonders ausgeprägt bei den Dikotyledonen und vielen Monokotyledonen, in Palisaden- und Schwammparenchym untergliedert. Ein "typisches" Blatt ist dorsiventral gebaut. Das Palisadenparenchym liegt dabei meist an der Blattoberseite unmittelbar unter der Epidermis. Das Schwammparenchym füllt den darunterliegenden Raum aus. Es ist von einem voluminösen Interzellularsystem durchsetzt, dessen Gasraum über die Spaltöffnungen in direktem Kontakt zur Außenwelt steht.
- 25 Das Palisadenparenchym besteht aus langgestreckten, zylindrischen Zellen. Bei einigen Arten sind die Zellen irregulär, gelegentlich sind sie gegabelt (Y-förmig: Armpalisadenparenchym). Solche Varianten kommen bei Farnen, Coniferen und einigen
- 30 wenigen Angiospermen (z.B. bei einigen Ranunculaceen- und Caprifoliaceenarten [Beispiel: Holunder]) vor. Neben der eben beschriebenen, am weitesten verbreiteten Organisationsform sind die folgenden Varianten nachgewiesen worden:
- 35 Palisadenparenchym an der Blattunterseite. Besonders auffällig bei Schuppenblättern. Beispiel: Lebensbaum (*Thuja*), sowie bei den Blättern des Bärlauchs (*Allium ursinum*).
- 40 Palisadenparenchym an beiden Blattseiten (Ober- und Unterseite). Häufig bei Pflanzen trockener Standorte (Xerophyten). Beispiel: Kompasspflanze (*Lactuca serriola*);

Ringförmig geschlossenes Palisadenparenchym: In zylindrisch organisierten Blättern und in Nadeln der Koniferen.

Die Variabilität der Schwammparenchymzellen und die Ausbildung des Schwammparenchyms selbst sind noch vielgestaltiger als die des Palisadenparenchyms. Es wird meist als Durchlüftungsgewebe bezeichnet, denn es enthält eine Vielzahl untereinander verbundener Interzellularen.

Das Mesophyll kann das so genannte Assimilationsgewebe umfassen, jedoch sind die Begriffe Mesophyll und Assimilationsgewebe nicht als Synonyme zu verwenden. Es gibt chloroplastenfreie Blätter, die sich in ihrem Aufbau nur unwesentlich von vergleichbaren, grünen Blättern unterscheiden. Folglich enthalten sie Mesophyll, doch eine Assimilation unterbleibt; umgekehrt findet eine Assimilation z.B. auch in Sproßabschnitten statt. Weitere Hilfsmittel zur Charakterisierung von Epidermis und Mesophyll findet der Fachmann z.B. in v. GUTTENBERG, H.: Lehrbuch der Allgemeinen Botanik. Berlin: Akademie-Verlag 1955 (5. Aufl.), HABERLANDT, G.: Physiologische Pflanzenanatomie. Leipzig: W. Engelmann 1924 (6. Aufl.); TROLL, W.: Morphologie der Pflanzen. Band 1: Vegetationsorgane. Berlin: Gebr. Borntraeger, 1937; TROLL, W.: Praktische Einführung in die Pflanzenmorphologie. Jena: VEB G. Thieme Verlag 1954/1957; TROLL, W., HÖHN, K.: Allgemeine Botanik. Stuttgart: F. Enke Verlag, 1973 (4. Aufl.).

In einer Ausführungsform wird die Epidermis biochemisch charakterisiert. Die Epidermis kann in einer Ausführungsform durch die Aktivität eines oder mehrerer der folgenden Promotoren gekennzeichnet werden:

- WIR5 (=GstA1), acc. X56012, Dudler & Schweizer, unveröff.
- GLP4, acc. AJ310534; Wei,Y.; Zhang,Z.; Andersen,C.H.; Schmelzer,E.; Gregersen,P.L.; Collinge,D.B.; Smedegaard-Petersen,V.; Thordal-Christensen,H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* 36, 101-112.
- GLP2a, acc. AJ237942, Schweizer,P., Christoffel,A. and Dudler,R. (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance, *Plant J* 20, 541-552.

- Prx7, acc. AJ003141, Kristensen BK, Ammitzböll H, Rasmussen SK & Nielsen KA. 2001. Transient expression of a vacuolar peroxidase increases susceptibility of epidermal barley cells to powdery mildew. *Molecular Plant Pathology*, 2(6), 311-317
- 5
- GerA, acc. AF250933 ; Wu S, Druka A, Horvath H, Kleinhofs A, Kannangara G & von Wettstein D, 2000. Functional characterization of seed coat-specific members of the barley germin gene family. *Plant Phys Biochem* 38, 685-698
- 10
- OsROC1, acc. AP004656
- RTBV, acc. AAV62708, AAV62707 ; Klöti, A, Henrich C, Bieri S, He X, Chen G, Burkhardt PK, Wünn J, Lucca, P, Hohn, T, Potrykus I & Fütterer J, 1999, Upstream and downstream sequence elements determine the specificity of the rice tungro bacilliform virus promoter and influence RNA production after transcription initiation. *PMB* 40, 249-266
- 15

20 In einer Ausführungsform wird die Epidermis dadurch gekennzeichnet, dass alle genannten Promoter in dem Gewebe oder der Zelle aktiv sind. In einer anderen Ausführungsform wird die Epidermis dadurch gekennzeichnet, dass nur ein Teil der Promotoren aktiv ist, z.B. 2, 3, 5 oder 7 oder mehr, mindestens jedoch einer der oben aufgezählten.

25 In einer Ausführungsform wird das Mesophyll biochemisch charakterisiert. Das Mesophyll kann in einer Ausführungsform durch die Aktivität eines oder mehrerer der folgenden Promotoren gekennzeichnet werden:

- PPCZm1 (=PEPC); Kausch,A.P., Owen,T.P., Zachwieja,S.J., Flynn, A.R. and Sheen,J. (2001) Mesophyll-specific, light and metabolic regulation of the C(4)PPCZm1 promoter in transgenic maize. *Plant Mol. Biol.* 45, 1-15
- 30
- OsrbcS, Kyozuka et al PlaNT Phys: 1993 102: Kyozuka J, McElroy D, Hayakawa T, Xie Y, Wu R & Shimamoto K. 1993. Light-regulated and cell-specific expression of tomato rbcsgusA and rice rbcsgusA fusion genes in transgenic rice. *Plant Phys* 102, 991-1000
- 35

- OsPPDK, acc. AC099041, unveröff.
  - TaGF-2.8, acc. M63223; Schweizer,P., Christoffel,A. and Dudler,R. (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance, Plant J 20, 541-552.
  - TaFBPase, acc. X53957; unveröff.
- 10
- TaWIS1, acc. AF467542; US 200220115849
  - HvBIS1, acc. AF467539; US 200220115849
  - ZmMIS1, acc. AF467514; US 200220115849
- 15
- HvPR1a, acc. X74939 ; Bryngelsson et al. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)
  - HvPR1b, acc. X74940; Bryngelsson et al. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)
- 20
- HvB1,3gluc; acc. AF479647; unveröff.
  - HvPrx8, acc. AJ276227; Kristensen et al MPP 2001 (siehe oben)
- 25
- HvPAL, acc. X97313 ; Wei,Y.; Zhang,Z.; Andersen,C.H.; Schmelzer,E.; Gregersen,P.L.; Collinge,D.B.; Smedegaard-Petersen,V.; Thordal-Christensen,H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant Molecular Biology 36, 101-112.
- 30
- In einer Ausführungsform wird das Mesophyll dadurch gekennzeichnet, dass alle genannten Promoter in dem Gewebe oder der Zelle aktiv sind. In einer anderen Ausführungsform wird das Mesophyll dadurch gekennzeichnet, dass nur ein Teil der Promotoren aktiv ist, z.B. 2, 3, 5 oder 7 oder mehr, mindestens jedoch einer der oben aufgezählten.
- 35
- In einer Ausführungsform sind in einer erfindungsgemäß verwendeten oder hergestellten Pflanze oder in einer erfindungsgemäßen Pflanze in der Epidermis und im Mesophyll alle genannten Promotoren aktiv. In einer Ausführungsform sind nur ein Teil der genannten Promotoren aktiv, z.B. 2, 5, 7 oder mehr, mindestens ist jedoch einer der oben aufgezählten Promotoren jeweils aktiv.
- 40

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des BI1-Proteins wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifisch, besonders bevorzugt mesophyll-spezifisch, beispielsweise durch rekombinante Expression einer
- 5 für besagtes BI1-Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors, bevorzugt unter Kontrolle eines mesophyll-spezifischen Promotors.
- 10 In einer Ausführungsform wird wie hierin beschrieben, die Expression oder Funktion des erfindungsgemäßen Proteins bzw. des hierin charakterisierten BI-1 im Mesophyll einer Pflanze erhöht. Eine Erhöhung der Expression kann wie unten beschrieben erreicht werden. Unter Erhöhung der Expression oder Funktion wird hierin sowohl die Aktivierung oder Steigerung der Expression oder
- 15 Funktion des endogenen Proteins einschließlich einer *de novo* Expression als auch eine Erhöhung oder Steigerung durch die Expression eines transgenen Proteins oder Faktors verstanden.
- 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines pflanzlichen BI1-Proteins kombiniert werden mit einem mlo-resistenten Phänotyp oder mit der Inhibierung oder Reduzierung im Vergleich zu einer Kontrollpflanze der Expression von MLO, RacB und/oder NaOx
- 25 in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen und/oder mit der Erhöhung der Expression oder Funktion von PEN2 und/oder PEN1 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in
- 30 einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird, mit der Maßgabe, dass die Expression eines pflanzlichen BI1-Proteins in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt oder reduziert wird und so eine kombinierte Resistenz
- 35 gegen sowohl nekrotrophe als auch biotrophe Pathogene erreicht wird.

In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte, rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Mehltauisolate (Büsches R

et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Das Mlo-Gen ist beschrieben (Büsches R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends 5 Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Mlo-Homologe aus anderen Getreidearten wurden isoliert.

Ein mlo-resistenter Phänotyp kann wie im Stand der Technik beschrieben erreicht werden. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben u.a. 10 in WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552.

Vorteilhaft kann in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Aktivität, Expression oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in 15 einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen inhibiert oder im Vergleich zu einer Kontrollpflanze oder einem Teil davon reduziert werden. Durch die Reduzierung der Aktivität oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder 20 einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird vorzugsweise die Resistenz oder Widerstandskraft gegen biotrophe Pathogene bei erfindungsgemäß hergestellten Pflanzen erhöht. In Kombination mit einer Reduktion oder Unterdrückung des nekrotischen Zelltods ist dies besonders 25 vorteilhaft. Die Aktivität oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx kann analog wie für MLO in WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552 und den weiteren unten genannten Schriften beschrieben reduziert oder inhibiert werden, deren Inhalt hiermit ausdrücklich als mit aufgenommen gilt, insbesondere um die Aktivität und Inhibierung von MLO zu beschreiben. Die Beschreibung der 30 genannten Schriften beschreibt Verfahren Methoden und besonders bevorzugte Ausführungsformen zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von MLO, die Beispiele geben konkret 35 an, wie dies ausgeführt werden kann.

Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von RacB ist in der WO 2003020939 ausführlich beschrieben, die hiermit ausdrücklich mit als in die vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt. Die Beschreibung der genannten Schrift 40 beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhi-

- bierung der Aktivität oder Funktion von BI-1, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von RacB gemäß den in der WO 2003020939 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt, insbesondere in einer Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von RacB ist in der WO 2003020939 ausführlich beschrieben. Der Fachmann findet in der WO 2003020939 die Sequenzen, die für RacB Proteine codieren und kann mit dem in der WO 2003020939 zur Verfügung gestellten Verfahren auch RacB identifizieren.
- Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von NaOX ist in der PCT/EP/03/07589 ausführlich beschrieben, die hiermit ausdrücklich mit als in die vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt.. Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von NaOx, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von NaOx gemäß den in der PCT/EP/03/07589 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt insbesondere in einer Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Der Fachmann findet in der PCT/EP/03/07589 die Sequenzen, die für NaOx Proteine codieren und kann mit dem in der PCT/EP/03/07589 zur Verfügung gestellten Verfahren auch NaOx identifizieren.

Vorteilhaft kann in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Aktivität, Expression oder Funktion von PEN1, PEN2 und/oder SNAP34 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen erhöht werden. Die Erhöhung der Aktivität, die auch eine de novo Expression umschließt, von PEN1, PEN2 und/oder SNAP 34 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon,

z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird vorzugsweise die Resistenz oder Widerstandskraft gegen biotrophe Pathogene bei erfindungsgemäß hergestellten Pflanzen erhöhen. In Kombination mit einer Reduktion oder Unterdrückung des nekrotischen Zelltods ist dies besonders vorteilhaft. Die Erhöhung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von PEN2 ist in der WO03074688 ausführlich beschrieben und die hiermit ausdrücklich als in der vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt. Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von PEN2, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von PEN2 gemäß den in der WO03074688 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt, insbesondere in Pflanzen, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Der Fachmann findet in der WO03074688 die Sequenzen, die für PEN2 Proteine codieren und kann mit dem in der WO03074688 zur Verfügung gestellten Verfahren auch PEN2 identifizieren. Die Expression von PEN1 und SNAP34 kann analog zu den in der WO03074688 beschriebenen Verfahren erhöht werden. Der Fachmann kann aufgrund des allgemeinen Fachwissens und des ihm bekannten Stands der Technik PEN1 und SNAP34-Nukleinsäuresequenzen und -Proteinsequenzen isolieren und überexprimieren. Seq ID NO.: 39 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für PEN1 aus Gerste kodiert, die Proteinsequenz ist in Seq ID No.: 40 beschrieben. Seq ID NO.: 41 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für PEN1 aus Arabidopsis thaliana kodiert, die Proteinsequenz ist in Seq ID No.: 42 beschrieben. PEN1 aus Arabidopsis thaliana ist veröffentlicht unter den accession numbers NM 202559 und NM 112015. Das Homolog aus Gerste wird als ROR2 offenbart in accession numbers AY246907 und AY246906. Es handelt sich um Mitglieder der recht großen Syntaxin-Proteinfamilie. Der Fachmann kann somit durch einfache Homologievergleiche weitere Syntaxin-Proteine identifizieren, die als potentielle Resistenzgene in dem erfindungsgemäßen Verfahren exprimiert werden.

Seq ID NO.: 43 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für SNAP34 aus Gerste kodiert, die Proteinsequenz ist in Seq ID No.: 44 beschrieben. Das SNAP-34 Homolog aus Gerste ist auch

veröffentlicht unter AY 247208 (SNAP-34). Homologe unbekannter Funktion, die eine Rolle in der Resistenz spielen könnten, sind veröffentlicht unter AY 247209 (SNAP-28) und AY 247210 (SNAP-25). Folgende Arabidopsis-Gene zeigen eine höhere Homologie zu  
5 Gerste SNAP34 als Gersten SNAP-28 bzw. SNAP-25 zu SNAP-34 und können somit als potentielle Resistenz-vermittelnde Gene vorteilhaft coüberexprimiert werden:

- AAM 62553 - Arabidopsis SNAP25a  
NP 200929 - Arabidopsis SNAP33b  
10 NP 172842 - Arabidopsis SNAP30  
NP 196405 - Arabidopsis SNAP29

Folglich betrifft die Erfindung auch eine Pflanze, in der mindestens weiterhin in der Epidermis ein Polypeptide überexprimiert wird, das codiert wird von einem Nukleinsäuremolekül, das die in Seq. ID No.: 39, 41 oder 43 oder eine der in den genannten Datenbankveröffentlichungen gezeigten Sequenzen umfasst oder das die in Seq. ID No.: 40, 42 oder 44 gezeigte oder eine der in den genannten Datenbankveröffentlichungen gezeigten Aminosäuresequenzen umfasst; oder das ein funktionelles Äquivalent davon ist oder das eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, mehr bevorzugt 80 %, noch mehr bevorzugt 90 % oder mehr zu den genannten Sequenzen auf Ebene des codierenden Nukleinsäuremoleküls oder bevorzugt auf Aminosäureebene hat, oder eine Pflanze, 15 in der konstitutiv oder in einem Teil, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epideriszellen das vorhergehend charakterisierte Polypeptide aktiviert wird oder dessen Aktivität oder Funktion erhöht wird.

30 Eine Reduktion oder Expression oder Aktivität kann durch dem Fachmann geläufige Verfahren bewirkt werden, z.B. Mutagenese, z.B. EMS, ggf. Tilling, siRNA; Ribozyme, Silencing, Knockout, etc. Verfahren zur Reduzierung sind insbesondere besschrieben in WO 2003020939, dessen Methoden an die hierin beschriebenen Sequenzen leicht angepasst werden können. Daher wird der Inhalt der WO 2003020939 explizit hierin mit aufgenommen.

Die Reduzierung oder Verminderung der Expression eines BI-1-40 Proteins, der BI-1-Aktivität oder der BI-1-Funktion kann auf vielfältige Art und Weise realisiert werden.

„Reduzierung“, „reduzieren“, „Verminderung“ oder „vermindern“ ist im Zusammenhang mit einem BI-1 Protein, einer BI-1 Aktivität

oder BI-1-Funktion weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität eines BI-1-Proteins.

- 5 Eine Verminderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine mengenmäßige Verringerung eines BI-1-Proteins bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des BI-1-Proteins (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von BI-1-Aktivität bzw. BI-1-Funktion oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des BI-1-Proteins).
- 10 Dabei wird die Expression eines bestimmten BI-1-Proteins oder die BI-1-Aktivität bzw. BI-1-Funktion in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80 %, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90 % vermindert.
- 15 Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Expression eines BI-1-Proteins, der BI-1-Aktivität oder BI-1-Funktion umfasst. Der Fachmann erkennt, dass eine Reihe verschiedener Methoden zur Verfügung stehen, um die Expression eines BI-1-Proteins, die BI-1-Aktivität oder die BI-1-Funktion in gewünschter Weise zu beeinflussen.

Eine Verminderung der BI-1-Aktivität oder der BI-1-Funktion wird bevorzugt durch eine verminderte Expression eines endogenen BI-1-Proteins erreicht.

Eine Verminderung der BI-1-Proteinmenge, BI-1-Aktivität oder BI-1-Funktion kann unter Verwendung nachfolgender Verfahren realisiert werden:

- 30 a) Einbringung einer doppelsträngigen BI-1 RNA-Nukleinsäuresequenz (BI-1-dsRNA) oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten;
- 35 b) Einbringung einer BI-1 antisense-Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die antisense-Nukleinsäuresequenz gegen ein BI-1-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein BI-1-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen.

- c) Einbringung einer BI-1 antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
  - 5 5 d) Einbringung von BI-1 sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
  - 10 e) Einbringung einer Nukleinsäuresequenz kodierend für dominant-negatives BI-1 Protein oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
  - 15 f) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen BI-1 - Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
  - 20 g) Einbringung von den BI-1 RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
  - 25 h) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen BI-1-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.
  - i) Einführung von Mutationen in endogenen BI-1 Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)
- wobei jedes der genannten Verfahren Epidermis-spezifisch durchgeführt werden muss, d.h. die Expression im Epidermisgewebe bleibt unverändert oder wird reduziert. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der BI-1-Expression, BI-1-Aktivität oder BI-1-Funktion im Sinne der Erfindung bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des BI-1-Proteins, des Transports des BI-1-Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines BI-1-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translations-elongation oder -termination umfassen.

Die Epidermis-sepzfische Reduktion kann z.B. durch eine transiente Anwendung der genannten Verfahren auf Epidermiszellen oder durch eine spezifische Transformation von im wesentlichen

nur Epidermiszellen oder durch eine Expressionskontrolle der aufgeführten Konstrukte unter einem Epidermisspezifischen Promoter oder sonstigen epidermisspezifischen Kontrollelement erfolgt.

5

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge kurz beschrieben:

- 10 a) Einbringung eines doppelsträngigen BI-1 RNA-Nukleinsäuremoleküls (BI-1-dsRNA)

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Eine effiziente Gensuppression kann auch bei transienter Expression oder nach transienter Transformation beispielsweise infolge einer biolistischen Transformation gezeigt werden (Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hocheffiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt wird. Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechenden knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

35 Das dsRNAi-Verfahren hat sich bei der Verminderung der Expression als besonders effizient und vorteilhaft erwiesen. Wie u.a. in WO 99/32619 beschrieben sind dsRNAi-Ansätze klassischen antisense-Ansätzen deutlich überlegen.

40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einführung in eine Pflanze (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organen, insbesondere Blattepidermis) die Verminderung eines BI-1 bewirken.

Das doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines BI-1 Proteins ist dadurch gekennzeichnet, dass

- 5        a) einer der beiden RNA Stränge im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil einer BI-1-Nukleinsäuresequenz, und
- 10      b) der jeweils andere RNA Strang im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil des identisch ist zu zumindest einem Teil des komplementärenen Stranges einer BI-1 Nukleinsäuresequenzes einer BI-1-Nukleinsäuresequenz.

15      In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines BI-1 Proteins

- 20      a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI-1 Protein, und
- 25      b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

30      In Bezug auf die doppelsträngigen RNA-Moleküle meint BI-1-Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 oder 38 oder ein funktionelles Äquivalent derselben.

35      „Im wesentlichen identisch“ meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der BI-1 Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirken. Bevorzugt beträgt die Homologie nach obiger Definition mindestens 50 % oder 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und einem Teilstück einer BI-1 Nukleinsäuresequenz (bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer BI-1 Nukleinsäuresequenz).

Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen, bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen. Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines BI-1 Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Strangs.

"Teil des "sense"-RNA-Transkriptes" einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI-1 Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben meint Fragmente einer RNA oder mRNA transkribiert von einer für ein BI-1-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben kodierenden Nukleinsäuresequenz, bevorzugt von einem BI-1-Gen. Dabei haben die Fragmente bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen, bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 500 Basen. Umfasst ist auch die vollständige transkribierte RNA oder mRNA.

Umfasst ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen dsRNA-Moleküle in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung einer Pathogenresistenz in Pflanzen.

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen polymerisierter Ribonukleotide bestehen. Es können ferner Modifikationen sowohl des Zucker-Phosphat-Gerüstes als auch der Nukleoside vorliegen. Beispielsweise können die Phosphodiesterbindungen der natürlichen RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie zumindest ein Stickstoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahingehend modifiziert werden, dass die

Aktivität beispielsweise von Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Solche und weitere Modifikationen sind weiter unten bei den Verfahren zur Stabilisierung von antisense-RNA beschrieben.

5

Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

10

Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch-synthetisch hergestellt werden.

15

Die doppelsträngige dsRNA Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden.

20

Die doppelsträngige Struktur kann ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären Strang oder ausgehend von zwei komplementären Strängen gebildet werden. Bei einem einzelnen, selbstkomplementären Strang, können "sense"- und "antisense"-Sequenz durch eine verbindende Sequenz ("Linker") verknüpft sein und beispielsweise eine Haarnadelstruktur ausbilden. Bevorzugt kann die verbindende Sequenz ein Intron sein, das nach Synthese der dsRNA herausgespleißt wird. Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

25

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

30

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

- 5        a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- 10      b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 15      c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden. Wie in WO 99/53050 kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch einen "Linker" (beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Konstruktes erfordern und die komplementären Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- oder "sense"-Strang einer dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden bevorzugt in einen Vektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren stabil (beispielsweise unter Verwendung von Selektionsmarkern) in das Genom einer Pflanze insertiert unter Kontrolle eines Epidermisspezifischen Promoters wie hierin aufgeführt, um eine dauerhafte Expression der dsRNA in der Epidermis zu gewährleisten.

Die dsRNA kann unter Verwendung einer Menge eingeführt werden, die zumindest ein Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

Wie bereits beschrieben, ist eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem BI-1 Gentranskript oder dem Gentranskript eines funktionell äquivalenten Gens nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der BI-1 Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der BI-1 Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die BI-1 Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Die hohe Sequenzhomologie zwischen den BI-1 Sequenzen aus Reis, Mais und Gerste lässt auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Proteins innerhalb von Pflanzen schließen, so dass die Expression einer dsRNA abgeleitet von einer der offebarten BI-1 Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 auch einen vorteilhaften Effekt in anderen Pflanzenarten haben dürfte.

Auch ist es aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen BI-1-Proteinen und ihren funktionellen Äquivalenten möglich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten BI-1-Sequenz eines Organismus generiert wurde, die Expression weiterer homologer BI-1-Proteine und/oder deren funktioneller Äquivalente des gleichen Organismus oder aber auch die Expression von BI-1-Proteinen in anderen verwandten Arten zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereich von BI-1-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

Die dsRNA kann entweder *in vivo* oder *in vitro* synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Polyadenylierungssignal) gebracht werden, wobei eine Epidermis-spezifische Expression der dsRNA angestrebt wird. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein.

Eine dsRNA kann chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden. Dazu können zelluläre RNA Polymerasen oder Bakteriophage RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Eine chemisch oder enzymatisch in vitro synthetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle, Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispielsweise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder teilweise aufgereinigt werden. Die dsRNA kann unmittelbar in die Zelle eingeführt werden oder aber auch extrazellulär (z.B. in den interstitialen Raum) appliziert werden.

Bevorzugt wird die Pflanze jedoch stabil mit einem Expressionskonstrukt, das die Expression der dsRNA in der Epidermis realisiert, transformiert. Entsprechende Verfahren sind weiter unten beschrieben.

b) Einbringung eines BI-1 antisense-Nukleinsäuremoleküls

Verfahren zur Suppression eines bestimmten Proteins durch Verhinderung der Akkumulation seiner mRNA durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu supprimierende BI-1-Zielprotein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genetischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genetischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen. Das Einbringen erfolgt so, dass die BI-1-Menge oder Funktion spezifisch in der Epidermis reduziert wird, z.B. durch transiente Transformation der Epidermis oder stabile Transformation unter Kontrolle der Expression eines entsprechenden Konstruktes mit einem Epidermis-spezifischen Promoters.

Eine antisense Nukleinsäuresequenz geeignet zur Verminderung eines BI-1-Proteins kann unter Verwendung der für dieses Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 oder 38 oder 5 kodierend für ein funktionelles Äquivalent derselben nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die antisense Nukleinsäuresequenz kann zu der gesamten transkribierten mRNA des besagten Proteins komplementär 10 sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart 15 für das besagte Protein umfasst. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, können aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können rekombinant exprimiert oder chemisch bzw. 20 enzymatisch unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren synthetisiert werden. Bei der chemischen Synthese können natürlich oder modifizierte Nukleotide verwendet werden. Modifizierte Nukleotide können der antisense 25 Nukleinsäuresequenz eine erhöhte biochemische Stabilität verleihen und zu einer erhöhten physikalischen Stabilität der Duplex gebildet aus antisense-Nukleinsäuresequenz und sense-Zielsequenz führen. Verwendet werden können beispielsweise Phosphorothioatderivative und Acridin-substituierte 30 Nukleotide wie 5-Fluorouracil, 5-Bromouracil, 5-Chlorouracil, 5-Iodouracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, β-D-Galactosylqueosin, Inosine, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, β-D-mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosine, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, 5-Meth- 35 40

yl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil und 2,6-Diaminopurin.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression eines BI-1-Proteins durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines BI-1-Gens (z.B. einem BI-1 Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des BI-1-Gens vermindert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

In einer weiteren Ausführungsform kann das antisense Nukleinsäuremolekül eine  $\alpha$ -anomere Nukleinsäure sein. Derartige  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen - im Unterschied zu den konventionellen  $\beta$ -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641). Das antisense Nukleinsäuremolekül kann ferner auch 2'-O-Methylribonukleotide (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6131-6148) oder chimäre RNA-DNA Analoge beinhalten (Inoue et al. (1987) FEBS Lett 215:327-330).

c) Einbringung eines BI-1 antisense-Nukleinsäuremoleküls kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym- "antisense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591.

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu supprimierenden Enzyms - z.B. BI-1 - katalytisch zu spalten und die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden BI-1 Proteins aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418). Die Expression erfolgt z.B. unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters.

30 d) Einbringung eines BI-1 sense-Nukleinsäuremoleküls zur Induktion einer Kosuppression

Die Epidermis-spezifische Expression eines BI-1 Nukleinsäuremoleküls in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden homologen, endogenen Gens in Epidermiszellen führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-299). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindern, homologe Gen

ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beispielsweise beschrieben bei Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2: 279-289 und in US 5,034,323.

Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI-1-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 oder 38 oder der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein funktionelles Äquivalent derselben.

e) Einbringung von Nukleinsäuremolekülen kodierend für ein dominant-negatives BI-1 Protein

Die Funktion oder Aktivität eines BI-1 Protein kann effektiv auch durch Epidermis-spezifische Expression einer dominant-negativen Variante dieses BI-1-Proteins in Epidermiszellen reduziert werden. Verfahren zur Verminderung der Funktion bzw. Aktivität eines Proteins mittels Koexpression seiner dominant-negativen Form sind dem Fachmann bekannt (Lagna G und Hemmati-Brivanlou A (1998) Current Topics in Developmental Biology 36:75-98; Perlmutter RM und Alberola-Ila J (1996) Current Opinion in Immunology 8(2):285-90; Sheppard D (1994) American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology. 11(1):1-6; Herskowitz I (1987) Nature 329 (6136):219-22).

Die bevorzugt zu mutierende Aminosäure in BI-1 Homologen aus anderen Arten kann beispielsweise mittels Computer-unterstütztem Vergleich ("Alignment") ermittelt werden. Diese Mutationen zum Erreichen einer dominant-negativen BI-1 Variante werden bevorzugt auf der Ebene der Nukleinsäuresequenz kodierend für BI-1 Proteine durchgeführt. Eine entsprechende Mutation kann beispielsweise durch PCR vermittelte *in vitro* Mutagenese unter Verwendung entsprechender Oligonukleotidprimer, durch welche die gewünschte Mutation eingeführt wird, realisiert werden. Dazu werden dem Fachmann geläufige Verfahren verwendet. Beispielsweise kann zu diesem Zweck der "LA PCR *in vitro* Mutagenesis Kit" (Takara Shuzo, Kyoto) verwendet werden. Ein Verfahren zur Herstellung einer

dominant-negativen Variante eines RacB-Proteins aus Mais ist auch in WO 00/15815 (Beispiel 4, S. 69) beschrieben.

5 Die Expression einer solchen Mutante kann dann z.B. unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters erfolgen.

f) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen BI-1 Gene, -RNAs oder Proteine

10 Eine Verminderung einer BI-1 Genexpression in der Epidermis ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regula-

15 torischen Bereichen, an und bewirken eine Repression des endogenen Gens. Die Verwendung eines solchen Verfahrens ermöglicht die Verminderung der Expression eines endogenen BI-1 Gens, ohne dass dessen Sequenz gentechnisch manipuliert werden muss. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al.

20 (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3<sup>rd</sup> (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616 -3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

35 Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines BI-1-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen. Die entsprechenden Abschnitte sind für den Fachmann mittels Datenbankabfrage aus der Genbank oder - ausgehend von einer BI-1 cDNA, deren Gen nicht in der Genbank vorhanden ist, durch Durchmusterung einer genomischen Bibliothek nach korrespondierenden genomischen Klonen erhältlich. Die dazu erforderlichen Verfahren sind

dem Fachmann geläufig, z.B. können diese Faktoren unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters oder anderer eine Epidermis-spezifische Expression vermittelnden Faktoren exprimiert werden.

5

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die das BI-1 Zielprotein selber inhibieren. Die proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. 10 Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben und dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in gentechnisch veränderten Tabakpflanzen zu 15 modulieren (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

20

Die Genexpression kann auch durch maßgeschneiderte, niedermolekulare synthetische Verbindungen unterdrückt werden, beispielsweise vom Polyamid-Typ (Dervan PB und Bürli RW (1999) Current Opinion in Chemical Biology 3:688-693; Gottesfeld JM et al. (2000) Gene Expr 9(1-2):77-91). Diese Oligomere bestehen aus den Bausteinen 3-(Dimethylamino)-propylamin, N-Methyl-3-hydroxypyrrrol, N-Methylimidazol und N-Methylpyrrole und können an jedes Stück doppelsträngiger DNA so angepasst werden, dass sie sequenzspezifisch in die große Furche binden und die Expression der dortigen Gensequenzen blockieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (siehe unter anderem Bremer RE et al. (2001) Bioorg Med Chem. 9(8):2093-103; Ansari AZ et al. (2001) Chem Biol. 8(6):583-92; Gottesfeld JM et al. (2001) J Mol Biol. 309(3):615-29; Wurtz NR et al. (2001) Org Lett 3(8):1201-3; Wang CC et al. (2001) Bioorg Med Chem 9(3):653-7; Urbach AR und Dervan PB (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(8):4343-8; 25 Chiang SY et al. (2000) J Biol Chem. 275(32):24246-54).

20

35

40

Alle genannten Faktoren werden Epidermis-spezifisch eingebracht, um eine Reduktion der BI-1-Aktivität lediglich in Epidermiszellen zu gewährleisten, z.B. durch Expression unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters, wie sie z.B. oben genannt sind.

- g) Einbringung von den BI-1 RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuremolekülen und entsprechenden Expressionskonstrukten
- 5 Die BI-1 Expression in der Epidermis kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen BI-1 RNA-Abbaus in Epidermiszellen mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al. (1999) Plant J. 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuremoleküle mit Homologie zu den zu supprimierenden Transkripten mittels viralen Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediiert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6): 937-46).
- 10
- 15
- 20 h) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen BI-1-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten
- 25 Zur Herstellung eines homolog rekombinanten Organismus mit verminderter BI-1-Aktivität in den Epidermiszellen verwendet man beispielsweise ein Nukleinsäurekonstrukt, das zumindest einen Teil eines endogenen BI-1 Gens enthält, das durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids so verändert wird, so dass die Funktionalität vermindert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und vermindert wird.
- 30
- 35
- 40 Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die veränderte Region an ihrem 5'- und 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen flankiert, die eine ausreichende Länge für die Ermöglichung der Rekombination aufweisen müssen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren einhundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe

5 Rekombination wird der Wirtsorganismus - zum Beispiel eine Pflanze - mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone unter Verwendung zum Beispiel einer Antibiotika- oder Herbizidresistenz selektioniert.

Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige 10 Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen 15 Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben, durch welche unspezifisch integrierte Sequenzen wieder deletiert werden können, was die Selektion erfolgreich über homologe Rekombination integrierter Ereignisse erleichtert. Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen kann verwendet werden, beispielhaft sind das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1, das FLP/FRT System der 20 Hefe, die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus E. coli und das R/RS System des pSR1 Plasmids genannt. Bevorzugt sind das Bacteriophagen P1 Cre/lox und das Hefe 25 FLP/FRT System. Das FLP/FRT und cre/lox Rekombinasesystem wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet (Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223: 369-378). Die Epidermis-spezifische Rekombination kann z.B. dadurch gewährleistet werden, dass die Expression der die Rekombination vermittelnden Systeme und Enzyme unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters erfolgt.

- 30
- i) Einführung von Mutationen in endogene BI-1 Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)
- 35 Weitere geeignete Methoden zur Verminderung der BI-1-Aktivität sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene BI-1 Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Epidermiszellen (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) sowie die Generierung von Knock-out-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20(5):963-976), ENU-(N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) - Mutagenese oder homologer Rekombination (Hohn B und Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323.). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden
- 40

erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

- 5 Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet. PTGS-Verfahren wie auch die Verminderung der BI-1-Funktion oder Aktivität mit dominant-negativen BI-1-Varianten sind besonders  
10 vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu supprimierenden endogenem Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz (bzw. zwischen dem endogenen Gen und seiner dominant-negativen Variante) geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz.  
15 Entsprechende Homologie-Kriterien sind bei der Beschreibung des dsRNAi-Verfahrens genannt und allgemein für PTGS-Verfahren oder dominant-negative Ansätze übertragbar. So kann man voraussichtlich unter Verwendung der BI-1-Nukleinsäuresequenzen auch die Expression von homologen BI-1-Proteinen in anderen Arten  
20 effektiv supprimieren, ohne dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden BI-1-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand. Analog kann man voraussichtlich auch unter Verwendung von dominant-negativen Varianten eines BI-1-Proteins die  
25 Funktion/Aktivität seines Homologs in anderen Pflanzenarten effektiv vermindern oder unterdrücken.

- Alle Substanzen und Verbindungen die direkt oder indirekt eine Verminderung der Proteinmenge, RNA-Menge, Genaktivität oder  
30 Proteinaktivität eines BI-1-Proteins bewirken, seien infolge unter der Bezeichnung "anti-BI-1"-Verbindungen zusammengefasst. Der Begriff "anti-BI-1"-Verbindung schließt explizit die in den oben beschriebenen Verfahren zum Einsatz kommenden Nuklein-säuresequenzen, Peptide, Proteine oder andere Faktoren ein.  
35 "Einbringung" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet eine "anti-BI-1"-Verbindung, direkt oder indirekt, in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen, Kompartiment oder Gewebe derselben einzuführen  
40 oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfasst. Die Einbringung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer "anti-BI-1"-Verbindung (beispielsweise einer dsRNA) führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen).

- Gemäß der unterschiedlichen Natur der oben beschriebenen Ansätze kann die "anti-BI-1"-Verbindung ihre Funktion direkt ausüben (zum Beispiel durch Insertion in ein endogenes BI-1 Gen). Die 5 Funktion kann aber auch indirekt nach Transkription in eine RNA (zum Beispiel bei antisense Ansätzen) oder nach Transkription und Translation in ein Protein (zum Beispiel bei Bindungsfaktoren) ausgeübt werden. Sowohl direkte als auch indirekt wirkende "anti-BI-1"-Verbindungen sind erfundungsgemäß umfasst.
- 10 Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.
- "Anti-BI-1" Verbindungen umfasst somit beispielsweise auch 15 rekombinante Expressionskonstrukte, die eine Expression (d.h. Transkription und ggf. Translation) beispielsweise einer BI-1-dsRNA oder einer BI-1 "antisense"-RNA Epidermis-spezifisch bedingen.
- 20 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül, dessen Expression (Transkription und ggf. Translation) eine "anti-BI-1"-Verbindung generiert, bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine Expression in 25 einem Organismus, bevorzugt in Pflanzen, gewährleistet, vorzugsweise Epidermis-spezifisch. Soll das Expressionskonstrukt direkt in die Pflanze eingeführt und die "anti-BI-1"-Verbindung (beispielsweise die BI-1 dsRNA) dort in plantae erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispielsweise Promotoren) bevorzugt, wobei aus dem oben gesagten 30 die Epidermis-spezifische Aktivität des Promoters für eine Epidermis-spezifische Reduktion von BI-1 in den meisten Ausführungsformen wie oben beschrieben zwingend ist. Die "anti-BI-1"-Verbindung kann jedoch auch in anderen Organismen oder in 35 vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden. In diesem sind all prokaryotischen oder eukaryotischen genetischen Kontrollelemente (beispielsweise Promotoren) bevorzugt, die die Expression in den jeweils für die Herstellung gewählten Organismus erlauben.
- 40 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel einer "anti-BI-1"-Verbindung) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum

Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben (cis- bzw. trans-Lokalisation). Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nuklein-

10 säuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

15

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben

20 sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymschnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt

25 kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden. Die Kontrollelemente vermitteln bevorzugt eine Epidermis-spezifische

30

35

40 Expression.

Die obengenannten Verfahren (a) bis (i) können auch für die Reduktion der Aktivität oder Funktion, insbesondere der Expression der anderen hier genannten Proteine eingesetzt

werden, insbesondere zur Reduktion von MLO, RacB und NaOx verwendet werden.

- Das BI1-Protein aus Gerste (hvBI1) wird vorwiegend im Mesophyll exprimiert (Beispiel 6) und infolge einer Infektion mit Blumeria (syn. Erysiphe) graminis f. sp. hordei hochreguliert (Beispiel 2). Die rekombinante mesophyll-spezifische Überexpression in mlo-resistenter Gerste führt - neben der Resistenz gegen insbesondere nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene - zu einer Blumeria (syn. Erysiphe) graminis f. sp. hordei -resistenten Pflanze, die keine nekrotischen Flecken („mlo-Flecken“; negative Begleiterscheinung der mlo-Resistenz) zeigt. Unter Ausnutzen dieses Effekts lassen sich die negativen Begleiterscheinungen der mlo-vermittelten Resistenz (Ertragseinbuße von ca. 5%, Jörgensen JH (1992) Euphytica 63: 141-152); Hypersuszeptibilität gegen nekrotrophe Pilze, Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133) unterdrücken, ohne dass die mlo-Resistenz selber beeinträchtigt wird.
- Ferner kann überraschenderweise gezeigt werden, dass eine Überexpression von BI1 eine Resistenz gegen Stressfaktoren wie nekrosen-auslösende Agenzien (isoliert z.B. aus nekrotrophen Schadpilzen; Beispiel 2) zur Folge hat.
- Das erfindungsgemäße Verfahren bietet demnach eine effiziente biotechnologische Strategie der Resistenz gegen Nekrotisierung durch endogenen, abiotischen und biotischen Stress - beispielsweise mlo-Flecken, Ozonschäden, nekrotrophe und hemibiotrophe Schadorganismen.
- BI1-Proteine scheinen zentrale Regulatoren der rasse-unspezifischen Pilzresistenz in Pflanzen zu sein. Dies ermöglicht eine breite Einsetzbarkeit in biotechnologischen Strategien zur Erhöhung der Pathogenresistenz in Pflanzen insbesondere der Pilzresistenz. Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. BI1-Proteine wurden in zahlreichen Pflanzen - Monokotyledonen und Dikotyledonen - identifiziert (s.o.).
- „Ungefähr“ meint im Rahmen dieser Erfindung im Zusammenhang mit Zahlen- oder Größenangaben einen Zahlen- oder Größenbereich um den angegebenen Zahlen- oder Größenwert herum. Im allgemeinen

meint der Begriff ungefähr einen Bereich von jeweils 20% des angegebenen Wertes nach oben und nach unten.

- "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten  
5 höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches.  
Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen,  
Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile,  
Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und  
andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen  
10 Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder  
strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem  
beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling  
meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen  
Entwicklungsstadium.
- 15 "Pflanze" umfaßt alle einjährige und mehrjährige,  
monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt  
beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen  
Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago,  
20 Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum,  
Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus,  
Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon,  
Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Ciahorium,  
Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum,  
25 Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panicum, Pennisetum,  
Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine,  
Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale,  
Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.
- 30 Der Begriff "Pflanze" umfaßt bevorzugt monokotyledone Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen,  
Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer  
sowie Zuckerrohr.
- 35 Ferner umfaßt der Begriff dikotyledonen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel
- Brassicaceae wie Raps, Rübsen, Kresse, Arabidopsis,  
Kohlarten,
  - Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder  
Erdnuss
- 40

- Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika,
- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,
- 5 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,  
sowie Lein (Flachs), Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe,
- 10 Süßkartoffel, Gurke, Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel, Zwiebel, Knoblauch, Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuß- und Weinarten. Baumarten umfaßt bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel,
- 15 Birne, Quitte.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders bevorzugt monokotyledone Gattungen und Arten mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.

Der Begriff "Streßfaktor" umfaßt im Rahmen der vorliegenden Erfindung biotische Streßfaktoren (wie insbesondere die unten aufgeführten Pathogene) sowie abiotische Streßfaktoren. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind als abiotische Streßfaktoren zu nennen: Chemischer Streß (z.B. durch Agrar- und/oder Umweltchemikalien), US-Bestrahlung, Hitze, Kälte, Wassermangel, erhöhte Feuchtigkeit.

"Streßresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Symptomen einer Pflanze infolge von Stress. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

40 "Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch mindestens ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des

Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

- 5 "Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Stress- oder Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße
- 10 Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Stress- oder Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein und mehrere Stressfaktoren bzw. Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten
- 15 Ausprägung der Stress- oder Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind
- 20 die Stress- oder Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % vermindert.
- 25 "Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens einen Stressfaktor oder Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Stress- bzw. Pathogenresistenz
- 30 geeignet sind. Dies können beispielsweise Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Nekrosen-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung zur Verwendung als Futter- oder
- 35 Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze, tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder

- 40 Nematoden. Besonders bevorzugt sind Pilze, insbesondere nekrotrophe oder hemibiotrophe Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die mesophyll-spezifische Expression eines BI1-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt, da insgesamt eine Resistenz gegen Stressfaktoren erzeugt wird.

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

5 1. Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene:

Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, 10 Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 bis 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen. Folgende englische und deutsche Termini können alternativ verwendet 15 werden:

Ährenfäule	-	ear rot / head blight
Stengelfäule	-	stalk rot
Wurzelfäule	-	root rot
20 Rost	-	rust
Falscher Mehltau		downy mildew

Weiter Übersetzungen können beispielsweise bei  
<http://www.bba.de/english/database/psmengl/pilz.htm> gefunden  
25 werden.

Tabelle 1: Erkrankungen hervorgerufen durch biotrophe, phytopathogene Pilze

Erkrankung	Pathogen
Braunrost	Puccinia recondita
Gelbrost	P. striiformis
Echter Mehltau	Erysiphe graminis / Blumeria graminis
Rost (gemeiner Mais)	Puccinia sorghi
Rost (südlicher Mais)	Puccinia polysora
Tabak Blattflecken	Cercospora nicotianae
Rost (tropischer Mais)	Physopella pallescens, P. zae = Angiopsora zae

Tabelle 2: Erkrankungen hervorgerufen durch nekrotrophe und/oder hemibiotrophe Pilze und Oomyceten

Erkrankung	Pathogen
Spelzenbräune	<i>Septoria (Stagonospora) nodorum</i>
Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
Ährenfusariosen	<i>Fusarium spp.</i>
Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercosporella herpotrichoides</i>
Flugbrand	<i>Ustilago spp.</i>
Kraut- und Knollenfäule	<i>Phytophthora infestans</i>
Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Anthracnose leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola Politis</i> ); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcatum Went</i> )
Anthracnose stalk rot	<i>Aspergillus ear and kernel rot</i>
Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	<i>Aspergillus flavus</i>
Black bundle disease	<i>Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz</i> (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i> )
Black kernel rot	<i>Acremonium strictum W. Gams = Cephalosporium acremonium Auct. non Corda</i>
Borde blanco	<i>Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae</i>
Brown spot (black spot, stalk rot)	<i>Marasmiellus sp.</i>
Cephalosporium kernel rot	<i>Physoderma maydis</i>
Charcoal rot	<i>Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium</i>
Corticium ear rot	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Curvularia leaf spot	<i>Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii</i>
	<i>Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus eragrostidis</i> ), <i>Curvularia inaequalis, C. intermedia</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus intermedius</i> ), <i>Curvularia lunata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus lunatus</i> ), <i>Curvularia pallescens</i> (teleomorph:

Erkrankung	Pathogen
	<i>Cochliobolus pallescens</i> ), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C. tuberculata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus tuberculatus</i> )
Didymella leaf spot	<i>Didymella exitalis</i>
Diplodia Ähren- und Stengelfäule	<i>Diplodia frumenti</i> (teleomorph: <i>Botryosphaeria festucae</i> )
Diplodia Ähren- und Stengelfäule, seed rot and seedling blight	<i>Diplodia maydis</i> = <i>Stenocarpella maydis</i>
Diplodia leaf spot or streak	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodialeaf macrospora</i>
Brown stripe downy mildew	<i>Sclerophthora rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
Crazy top downy mildew	<i>Sclerophthora macrospora</i> = <i>Sclerospora macrospora</i>
Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	<i>Sclerospora graminicola</i>
Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	<i>Nigrospora oryzae</i> (teleomorph: <i>Khuskia oryzae</i> )
Ährenfäulen (minor)	<i>Alternaria alternata</i> = <i>A. tenuis</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> (teleomorph: <i>Botryotinia fuckeliana</i> ), <i>Cunninghamella</i> sp., <i>Curvularia pallescens</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> = <i>Cephalotrichum stemonitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gonatobotrys simplex</i> , <i>Pithomyces maydicus</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh., <i>R. stolonifer</i> = <i>R. nigricans</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i>
Ergot (horse's tooth)	<i>Claviceps gigantea</i> (anamorph: <i>Sphacelia</i> sp.)
Eyespot	<i>Aureobasidium zeae</i> = <i>Kabatiella zeae</i>
Fusarium Ähren- und Stengelfäule	<i>Fusarium subglutinans</i> = <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Fusarium moniliforme</i> (teleomorph: <i>Gibberella fujikuroi</i> )
Fusarium Stengelfäule, seedling root rot	<i>Fusarium avenaceum</i> (teleomorph: <i>Gibberella avenacea</i> )

Erkrankung	Pathogen
Gibberella Ähren- u. Stengelfäule	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
Graue Ährenfäule	Botryosphaeria ziae = Physalospora ziae (anamorph: Macrophoma ziae)
Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
Hormodendrum Ährenfäule (Cladosporium Fäule)	Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera proliata (teleomorph: Setosphaeria proliata) Graphium penicilliodes, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium ziae, Ophiophaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria ziae, S. zeicola, S. zeina
Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
Penicillium Ährenfäule (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
Phaeocytostroma Stengel- und Wurzelfäule	Phaeocytostroma ambiguum, = Phaeocytosporella ziae
Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
Physalospora Ährenfäule (Botryosphaeria Ährenfäule)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)

Erkrankung	Pathogen
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
Pyrenopeziza Stengel- und Wurzelfäule	Phoma terrestris = Pyrenopeziza terrestris
Pythium Wurzelfäule	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
Pythium Stengelfäule	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
Rhizoctonia Ährenfäule (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
Rhizoctonia Wurzel- und Stengelfäule	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae
Wurzelfäulen (minor)	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictyochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)
Falscher Java Mehltau	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
Falscher Philippinen Mehltau	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
Falscher Sorghum Mehltau	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
Falscher Zuckerrohr-Mehltau	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
Sclerotium Ährenfäule (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium

Erkrankung	Pathogen
	avenaceum, <i>F. culmorum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Gibberella zeae</i> (anamorph: <i>F. graminearum</i> ), <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>R. zeae</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Spicaria</i> sp.
Selenophoma leaf spot	<i>Selenophoma</i> sp.
Sheath rot	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Shuck rot	<i>Myrothecium gramineum</i>
Silage mold	<i>Monascus purpureus</i> , <i>M ruber</i>
Flugbrand (Smut, common)	<i>Ustilago zeae</i> = <i>U. maydis</i>
Smut, false	<i>Ustilaginoidea virens</i>
Kolbenbrand (Smut, head)	<i>Sphaelotheca reiliiana</i> = <i>Sporisorium holcisorghi</i>
Southern corn leaf blight and stalk rot	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (anamorph: <i>Bipolaris maydis</i> = <i>Helminthosporium maydis</i> )
Southern leaf spot	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia macrospora</i>
Stengelfäulen (minor)	<i>Cercospora sorghi</i> , <i>Fusarium episphaeria</i> , <i>F. merismoides</i> , <i>F. oxysporum</i> Schlechtend, <i>F. poae</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. solani</i> (teleomorph: <i>Nectria haematococca</i> ), <i>F. tricinctum</i> , <i>Mariannaea elegans</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Rhopographus zeae</i> , <i>Spicaria</i> sp.
Lagerfäulen (Storage rots)	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp. und weitere Pilze
Tar spot	<i>Phyllachora maydis</i>
Trichoderma ear rot and root rot	<i>Trichoderma viride</i> = <i>T. lignorum</i> teleomorph: <i>Hypocrea</i> sp.
White ear rot, root and stalk rot	<i>Stenocarpella maydis</i> = <i>Diplodia zeae</i>
Yellow leaf blight	<i>Ascochyta ischaemi</i> , <i>Phyllosticta maydis</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella zae-maydis</i> )
Zonate leaf spot	<i>Gloeocercospora sorghi</i>

Tabelle 4: Erkrankungen hervorgerufen durch Pilze und Oomyceten mit unklarer Einstufung hinsichtlich biotrophen, hemibiotrophen bzw. nekrotrophen Verhaltens

Erkrankung	Pathogen
Hyalothyridium leaf spot	<i>Hyalothyridium maydis</i>
Late wilt	<i>Cephalosporium maydis</i>

5

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie *Plasmodiophora brassicae* (Kohlernie), *Spongospora subterranea*, *Polymyxa graminis*,
- 10 - Oomycota wie *Bremia lactucae* (Falscher Mehltau an Salat), *Peronospora* (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (*P. antirrhini*), Zwiebel (*P. destructor*), Spinat (*P. effusa*), Sojabohne (*P. manchurica*), Tabak (Blauschimmel; *P. tabacina*) Alfalfa und Klee (*P. trifolium*), *Pseudoperonospora humuli* (Falscher Mehltau an Hopfen), *Plasmopara* (Falscher Mehltau bei Trauben) (*P. viticola*) und Sonnenblume (*P. halstedii*), *Sclerophthora macrospora* (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), *Pythium* (z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch *P. debaryanum*), *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), *Albugo spec.*.
- 15 - Ascomycota wie *Microdochium nivale* (Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule v.a. bei Weizen), *Fusarium oxysporum* (*Fusarium-Welke* an Tomate), *Blumeria graminis* (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. *hordei*) und Weizen (f.sp. *tritici*)), *Erysiphe pisi* (Erbsenmehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotiorum*

(Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).

- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an 5 Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (Kolbenbrand bei Sorghum), *Melampsora lini* (Rost bei Flachs), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an 10 Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* 15 (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (Wurzel- und Stengelfäule bei zahlreichen Pflanzen).
- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria* 20 (*Stagonospora*) nodorum (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercosporella herpotrichoides* (Halmbuschkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an 25 Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* 30 (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).
- 35 Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* und *Fusarium poae* (Ährenfäule an Weizen), *Fusarium oxysporum* 40 (Fusarium-Welke an Tomate), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Sclerotinia sclerotiorum* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Septoria* (*Stagonospora*) nodorum und *Septoria tritici* (Spelzenbräune an Weizen), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), *Phoma lingam* (Umfallkrankheit,

Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

2. Bakterielle Pathogene:

5

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 5 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

10

Tabelle 5: Bakterielle Erkrankungen

Erkrankung	Pathogen
Bacterial leaf blight and stalk rot	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
Bacterial leaf spot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>
Bakterielle Stengelfäule	<i>Enterobacter dissolvens</i> = <i>Erwinia dissolvens</i>
Schwarzbeinigkeit ("Bacterial stalk and top rot")	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>
Bacterial stripe	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
Chocolate spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>
Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>andnebraskense</i>
Holcus spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
Seed rot-seedling blight	<i>Bacillus subtilis</i>
Stewart's disease (bacterial wilt)	<i>Pantoea stewartii</i> = <i>Erwinia stewartii</i>
Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	<i>Spiroplasma kunkelii</i>

15

Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien: *Corynebacterium sepedonicum* (Bakterienringfäule an Kartoffel), *Erwinia carotovora* (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), *Erwinia amylovora* (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), *Streptomyces scabies* (Kartoffelschorf), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wildfeuer an Tabak), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), *Pseudomonas syringae* pv.

tomato ("bacterial speck" an Tomate), Xanthomonas campestris pv. malvacearum (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und Xanthomonas campestris pv. oryzae (Bakterienfäule an Reis und anderen Gräsern).

5

### 3. Virale Pathogene:

"Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein wie beispielsweise Tabak- oder oder Cucumber-Mosaiv Virus,

10 Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind die in Tabelle 6 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15

Tabelle 6: Virale Erkrankungen

Krankheit	Pathogen
American wheat striate (wheat striate mosaic)	American wheat striate mosaic virus (AWSMV)
Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)
Maize mosaic (corn leaf	Maize mosaic virus (MMV)

Krankheit	Pathogen
stripe, enanismo rayado)	
Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
Maize red leaf and red stripe	Mollicute
Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)
Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
Maize streak	Maize streak virus (MSV)
Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
Maize stunting	Maize stunting virus
Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
Maize white leaf	Maize white leaf virus
Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)

Krankheit	Pathogen
Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

#### 4. Tierische Schädlinge

##### 4.1 Insekten Pathogene:

- 5 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen. Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera,
- 10 Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer), *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata*, *Diabrotica virgifera*, *Agrotis 15 epsilon*, *Crymodes devastator*, *Feltia ducens*, *Agrotis gladiaria*, *Melanotus spp.*, *Aeolus mellillus*, *Aeolus mancus*, *Horistonotus uhlerii*, *Sphenophorus maidis*, *Sphenophorus zae*, *Sphenophorus parvulus*, *Sphenophorus callosus*, *Phyllogphaga spp.*, *Anuraphis maidiradicis*, *Delia platura*, *Colaspis brunnea*, *Stenolophus 20 lecontei* und *Clivinia impressifrons*.

Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*), die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus *Rhopalosiphum padi*,

25 Grosse Getreideblattlaus *Sitobion avenae*).

##### 4.2 Nematoden:

- 30 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 7 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 7: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	Dolichodorus spp., D. heterocephalus
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen	Ditylenchus dipsaci
Burrowing	Radopholus similis
Haferzystenälchen	Heterodera avenae, H. zae, Punctodera chalcoensis
Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
False root-knot	Nacobbus dorsalis
Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zae
Needle	Longidorus spp., L. brevianulatus
Ring	Criconemella spp., C. ornata
Wurzelgallenälchen	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
Spiral	Helicotylenchus spp.
Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
Stunt	Tylenchorhynchus dubius

- Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und  
5 *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a.  
Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen  
an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae*  
(Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus  
dipsaci* (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen,  
10 Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen,  
Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), *Meloidogyne hapla*  
(Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel,  
Zuckerrübe, Luzerne).  
15 Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-  
Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

## 1. Gerste:

5 Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: *Puccinia graminis* f.sp.  
hordei, *Blumeria (Erysiphe) graminis* f.sp. hordei, barley yellow  
dwarf virus (BYDV),

Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European  
corn borer); *Agrotis ipsilon*; *Schizaphis graminum*; *Blissus*  
10 *leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*; *Euschistus servus*;  
*Deliaplatura*; *Mayetiola destructor*; *Petrobia latens*.

## 2. Sojabohne:

15 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora*  
*megasperma* fsp.*glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia*  
*solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe*  
*phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum*  
var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*,  
20 *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum*  
*dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*,  
*Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*,  
*Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v.  
*phaseoli*, *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*,  
25 *Phialophora gregata*, *Sojabohnen Mosaikvirus*, *Glomerella*  
*glycines*, *Tobacco Ring spot virus*, *Tobacco Streak virus*,  
*Phakopsorapachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*,  
*Pythium debaryanum*, *Tomato spotted wilt virus*, *Heterodera*  
*glycines* *Fusarium solani*.

30 Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudoplusia includens*;  
*Anticarsia gemmatalis*; *Plathypena scabra*; *Ostrinia nubilalis*;  
*Agrotis ipsilon*; *Spodoptera exigua*; *Heliothis virescens*;  
*Helicoverpa zea*; *Epilachna varivestis*; *Myzus persicae*; *Empoasca*  
35 *fabae*; *Acrosternum hilare*; *Melanoplus femur-rubrum*; *Melanoplus*  
*differentialis*; *Hylemya platura*; *Sericothrips variabilis*; *Thrips*  
*tabaci*; *Tetranychus turkestanicus*; *Tetranychus urticae*;

## 3. Raps:

40 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*,  
*Alternaria brassicacearum*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia*  
*solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassiccola*,

Pythium ultimum, Peronospora parasitica, Fusarium roseum,  
Alternaria alternata.

4. Alfalfa:

5

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Clavibacter  
michiganense subsp. insidiosum, Pythium ultimum, Pythium  
irregulare, Pythium splendens, Pythium debaryanum, Pythium  
aphanidermatum, Phytophthora megasperma, Peronospora  
trifoliorum, Phoma medicaginis var. medicaginis, Cercospora  
medicaginis, Pseudopeziza medicaginis, Leptotrichila  
medicaginis, Fusarium, Xanthomonas campestris p.v. alfalfae,  
Aphanomyces euteiches, Stemphylium herbarum, Stemphylium  
alfalfae.

15

5. Weizen:

Pilz-,bakterielle oder virale Pathogene: Pseudomonas syringae  
p.v. atrofaciens, Urocystis agropyri, Xanthomonas campestris  
p.v. translucens, Pseudomonas syringae p.v. syringae, Alternaria  
alternata, Cladosporium herbarum, Fusarium graminearum, Fusarium  
avenaceum, Fusarium culmorum, Ustilago tritici, Ascochyta  
tritici, Cephalosporium gramineum, Collotrichum graminicola,  
Erysiphe graminis f.sp. tritici, Puccinia graminis f.sp.  
tritici, Puccinia recondita f.sp. tritici, Puccinia striiformis,  
Pyrenophora tritici-repentis, Septoria (Stagonospora) nodorum,  
Septoria tritici, Septoria avenae, Pseudocercosporella  
herpotrichoides, Rhizoctonia solani, Rhizoctonia cerealis,  
Gaeumannomyces graminis var. tritici, Pythium aphanidermatum,  
Pythium arrhenomannes, Pythium ultimum, Bipolaris sorokiniana,  
Barley Yellow Dwarf Virus, Brome Mosaic Virus, Soil Borne Wheat  
Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak  
Virus, American Wheat Striate Virus, Claviceps purpurea,  
Tilletia tritici, Tilletia laevis, Ustilago tritici, Tilletia  
indica, Rhizoctonia solani, Pythium arrhenomannes, Pythium  
gramicola, Pythium aphanidermatum, High Plains Virus, European  
Wheat Striate Virus, Puccinia graminis f.sp. tritici (Wheat stem  
rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. tritici (Wheat Powdery  
Mildew).

40

Pathogene Insekten / Nematoden: Pseudaletia unipunctata;  
Spodoptera, frugiperda; Elasmopalpus lignosellus; Agrotis  
orthogonia; Elasmopalpus Zignosellus; Oulema melanopus; Hypera  
punctata; Diabrotica undecimpunctata howardi; Russian wheat

aphid; *Schizaphis graminum*; *Macrosiphum avenae*; *Melanoplus femur-rubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Melanoplus sanguinipes*; *Mayetiola destructor*; *Sitodiplosis mosellana*; *Meromyza americana*; *Hylemya coarctata*; *Frankliniella fusca*; *Cephus cinctus*; *Aceria tulipae*;

6. Sonnenblume:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Plasmophora halstedii*,  
10 *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aster Yellows*, *Septoria helianthi*,  
*Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*,  
*Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*,  
*Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*,  
*Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*,  
15 *Erwinia carotovorum p.v. Carotovora*, *Cephalosporium acremonium*,  
*Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*.

Pathogene Insekten / Nematoden: *Suleima helianthana*; *Homoeosoma electellum*; *zygogramma exclamationis*; *Bothyrus gibbosus*;  
20 *Neolasioptera murtfeldtiana*;

7. Mais:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Fusarium moniliforme*  
25 var. *subglutinans*, *Erwinia stewartii*, *Fusarium moniliforme*,  
*Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydis*  
(*Diplodia maydis*), *Pythium irregularare*, *Pythium debaryanum*,  
*Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* O, T  
30 (*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I, II &  
III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III,  
*Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*,  
*Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*,  
35 *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*,  
*Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallens*,  
*Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense*, *Trichoderma viride*,  
*Maize Dwarf Mosaic Virus A & B*, *Wheat Streak Mosaic Virus*, *Maize Chlorotic Dwarf Virus*, *Claviceps sorghi*, *Pseudonomas avenae*,  
40 *Erwinia chrysanthemi* p.v. *Zea*, *Erwinia carotovora*, *Cornstunt spiroplasma*, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*,  
*Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippensis*,  
*Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*,  
*Spacelotheca reiliana*, *Physopella zae*, *Cephalosporium maydis*,

Caphalosporium acremonium, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus, Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.

5

Pathogene Insekten / Nematoden: Ostrinia nubilalis; Agrotis epsilon; Helicoverpa zea; Spodoptera frugiperda; Diatraea grandiosella; Elasmopalpus lignosellus; Diatraea saccharalis; Diabrotica virgifera; Diabrotica longicornis barberi; Diabrotica undecimpunctata howardi; Melanotus spp.; Cyclocephala borealis; Cyclocephala immaculata; Popillia japonica; Chaetocnema pulicaria; Sphenophorus maidis; Rhopalosiphum maidis; Anuraphis maidiradicis; Blissus leucopterus leucopterus; Melanoplus femur-rubrum; Melanoplus sanguinipes; Hylemya platura; Agromyza parvicornis; Anaphothrips obscurus; Solenopsis milesta; Tetranychus urticae.

8. Sorghum:

20 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Exserohilum turcicum, Colletotrichum graminicola (Glomerella graminicola), Cercospora sorghi, Gloeocercospora sorghi, Ascochyta sorghina, Pseudomonas syringae p.v. syringae, Xanthomonas campestris p.v. holcicola, Pseudomonas andropogonis, Puccinia purpurea, Macrophomina phaseolina, Perconia circinata, Fusarium moniliforme, Alternaria alternate, Bipolaris sorghicola, Helmintosporium sorghicola, Curvularia lunata, Phoma insidiosa, Pseudomonas avenae (Pseudomonas albo-precipitans), Ramulispora sorghi, Ramulispora sorghicola, Phyllachara sacchari, Sporisorium reilianum (Sphacelotheca reiliana), Sphacelotheca cruenta, Sporisorium sorghi, Sugarcane mosaic H, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, Claviceps sorghi, Rhizoctonia solani, Acremonium strictum, Sclerotophthora macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinensis, Sclerospora graminicola, 35 Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola.

Pathogene Insekten / Nematoden: Chilo partellus; Spodoptera frugiperda; Helicoverpa zea; Elasmopalpus lignosellus; Feltia subterranea; Phyllophaga crinita; Eleodes, Conoderus und Aeolus spp.; Oulema melanopus; Chaetocnema pulicaria; Sphenophorus maidis; Rhopalosiphum maidis; Siphanta; Blissus leucopterus leucopterus; Contarinia sorghicola; Tetranychus cinnabarinus; Tetranychus urticae.

## 9. Baumwolle:

Pathogene Insekten / Nematoden: Heliothis virescens; Helicoverpa  
5 zea; Spodoptera exigua; Pectinophora gossypiella; Anthonomus  
grandis grandis; Aphis gossypii; Pseudatomoscelis seriatus;  
Trialeurodes abutilonea; Lygus lineolaris; Melanoplus  
femurrubrum; Melanoplus differentialis; Thrips tabaci (onion  
thrips); Frankliniella fusca; Tetranychus cinnabarinus;  
10 Tetranychus urticae.

## 10. Reis:

Pathogene Insekten / Nematoden: Diatraea saccharalis; Spodoptera  
15 frugiperda; Helicoverpa zea; Colaspis brunnea; Lissorhoptrus  
oryzophilus; Sitophilus oryzae; Nephrotettix nigropictus; Blissus  
leucopterus leucopterus; Acrosternum hilare.

## 11. Raps:

20 Pathogene Insekten / Nematoden: Brevicoryne brassicae;  
Phyilotreta cruciferae; Mamestra configurata; Plutella  
xylostella; Delia ssp..

25 "BII-Protein" meint im Rahmen der Erfindung Polypeptide die  
mindestens eine Sequenz die eine Homologie von mindestens 50%,  
bevorzugt mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%,  
ganz besonders bevorzugt 100% aufweisen zu einem BII-  
Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 30
- a) H(L/I)KXVY
  - b) AXGA(Y/F)XH
  - c) NIGG
  - d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR
  - e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL
  - f) DP(S/G)(L/I)(I/L)
  - 35 g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T)
  - h) YL(Y/F)LGG, bevorzugt EYLYLGG
  - i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W
  - 40 j) DTGX(I/V)(I/V)E

Besonders bevorzugt ist dabei das BI- Konsensusmotiv f)  
YL(Y/F)LGG, ganz besonders bevorzugt (EYLYLGG). Dieses Motiv ist  
charakteristisch für pflanzliche BII-Proteine.

Besonders bevorzugt kommen Sequenzen mit Homologie zu mindestens 2 oder 3 dieser Motive (a bis g) in einem BI1-Protein vor, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt 5 alle Motive a bis j. Weitere BI1 typischen Sequenzmotive kann der Fachmann unschwer aus dem Sequenzvergleich von BI1-Proteine - wie in Fig. 1 oder 6 dargestellt - ableiten.

Insbesondere bevorzugt sind BI-Proteine, die kodiert werden 10 durch ein Polypeptid das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 38, und 15
- b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50%, bevorzugt mindstens 70%, besonders bevorzugt mindstens 90%, ganz besonders bevorzugt mindstens 95% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 20 26, 28, 30, 32 und 38 aufweisen,
- c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10, bevorzugt 20, besonders bevorzugt 50 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 25 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 38 umfassen.

Erfindungsgemäß von dem Begriff BI-Protein umfasst sind insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der BI1-Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 und 38 sowie homologe Polypeptide aus anderen Organismen, bevorzugt Pflanzen, welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer 35 Aminosäurereste.

Umfaßt sind insofern auch Ausführungsformen unter Verwendung von BI1-Proteinen aus nicht-pflanzlichen Organismen wie beispielsweise Mensch (GenBank Acc.-No.: P55061), Ratte (GenBank Acc.-No.: P55062) oder Drosophila (GenBank Acc.-No.: Q9VSH3). 40 Zwischen pflanzlichen und nicht-pflanzlichen BI1-Proteinen konservierte Motive können durch Sequenzvergleiche leicht identifiziert werden (vgl. Alignment in Bolduc et al. (2003) Planta 216:377-386; Fig. 1 und 6).

Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation eines Polypeptides gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 und 38 erhält.

5

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten BI1-Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. durch

- a) Datenbanksuche in Banken von Organismen, deren genomische  
10 oder cDNA Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, unter  
Verwendung der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Suchsequenz  
oder
- b) Durchmustern von Gen- oder cDNA-Bibliotheken unter Verwendung  
15 der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Sonde -

aufgefunden werden. Die Durchmusterung von cDNA- oder  
genomischen Bibliotheken (beispielsweise unter Verwendung einer  
der unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23,  
20 25, 27, 29, 31 und 37 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder  
Teilen derselben als Sonde), ist ein dem Fachmann geläufiges  
Verfahren, um Homologe in anderen Arten zu identifizieren. Dabei  
haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3,  
5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37  
25 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt  
mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz  
besonders bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten bevorzugt  
mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann  
auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17,  
30 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37 beschriebenen Sequenzen  
komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die  
Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte  
35 Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des  
Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0,  
University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison,  
USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter  
Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

40

Gap Weight: .50

Length Weight: 3

Average Match: 10

Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem

- 5 Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge

- 10 verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

15 Gap Weight: 8 Length Weight: 2

Average Match: 2,912 Average Mismatch:-2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

- 25 BI1-Proteine umfassen auch solche Polypeptide die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 , 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37 beschriebenen BI1 Nukleinsäuresequenz, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vorgenannten hybridisieren und die gleichen wesentlichen Eigenschaften wie die unter SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 und 38 beschriebenen Proteine haben.

- 35 Der Begriff "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, 40 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit

geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0).

Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes

5 von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere  
10 variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

15 "Wesentliche Eigenschaften" meint in Bezug auf ein BI-Protein beispielsweise eine oder mehr nachfolgender Eigenschaften:

a) Verleihung oder Steigerung der Pathogenresistenz gegen zumindest ein Pathogen bei Erhöhung Proteinmenge oder  
20 Funktion des besagten BI-Proteins in mindestens einem Gewebe der Pflanze, wobei besagtes Gewebe nicht die Blattepidermis ist.

b) Ausbleiben eines spontan-induzierten Zelltodes bei Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins  
25

c) Die Eigenschaft bei transienter co-Transfektion von Bax mit besagtem BI1-Protein beispielsweise in HEK293 Zellen die BAX-induzierte Apoptose signifikant zu inhibieren.  
30 Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386).

d) Das Vorliegen von fünf bis sieben putativen Transmembrandomänen innerhalb der besagten BI1-Proteins.  
35

e) Eine präferentielle Lokalisation in Zellmembranen, insbesondere der Kernhüll-, ER- und/oder Thylakoidmembran.

40 Dabei kann die quantitative Ausprägung besagter Eigenschaften eines BI1-Proteins nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten für das BI1-Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 oder 38 abweichen.

Der Begriff "Erhöhung der BI1 Proteinmenge oder Funktion" ist im Rahmen dieser Erfindung breit zu verstehen und kann auf unterschiedlichen zellbiologischen Mechanismen beruhen.

- 5 "Proteinmenge" meint die Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment.

"Erhöhung der Proteinmenge" meint die mengenmäßige Erhöhung der Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, 10 Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment. - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, aber unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). 15 Die Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Die Bestimmung 20 der Proteinmenge kann durch verschiedene dem Fachmann geläufige Verfahren erfolgen. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 25 72:248-254). Ferner kann eine Quantifizierung über immunologische Methoden wie beispielsweise Western-Blot erfolgen. Die Herstellung entsprechender BI1-Antikörper sowie die Durchführung von BI1-Western-Blots ist beschrieben (Bolduc et al. (2002) FEBS Lett 532:111-114). Eine indirekte 30 Quantifizierung kann über Northern-Blots realisiert werden, wobei die mRNA Menge in der Regel gut mit der resultierenden Proteinmenge korreliert. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (u.a. Bolduc et al. (2003) Planta 216:377-386; Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).

- 35 "Funktion" meint bevorzugt die Eigenschaft eines BI1-Proteins den spontan-induzierten Zelltodes zu vermindern und/oder die Eigenschaft, die apoptose-indizierende Wirkung von Bax zu inhibieren. Entsprechende Funktionen zählen zu den wesentlichen 40 Eigenschaften eines BI1-Proteins.

"Erhöhung" der Funktion meint im Rahmen dieser Erfindung beispielsweise die mengenmäßige Steigerung der inhibitorischen Wirkung auf den Bax-induzierten apoptotischen Zelltod, welche

durch dem Fachmann geläufige Verfahren quantifiziert werden kann (s.o.) Der Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um 5 mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Verfahren zur Erhöhung der Funktion umfassen neben den oben beschriebenen Verfahren zur Erhöhung der Proteinmenge (die auch immer die Funktion erhöht) ferner beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - insbesondere das Einführen von Mutationen 10 in ein BI1-Protein.

Die BI1-Proteinmenge kann beispielhaft jedoch nicht einschränkend durch eines der nachfolgenden Verfahren erhöht werden:

- 15 a) Rekombinante Expression oder Überexpression eines BI1-Proteins durch Einringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 20 b) Modifikation (z.B. Austausch) der regulatorischen Regionen (z.B. der Promotorregion) eines endogenen BI1-Gens beispielsweise Austausch gegen einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 25 c) Insertion einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein in das pflanzliche Genom hinter einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 30 d) Erhöhung der Expression eines endogenen BI1-Proteins durch Einringen eines Transkriptionsfaktors (z.B. eines artifiziellen Transkriptionsfaktors aus der Klasse der Zinkfingerproteine) geeignet zur Induktion der Expression besagten BI1-Proteins. Bevorzugt ist das Einringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für besagten Transkriptionsfaktor unter Kontrolle eines gewebespezifischen
- 35
- 40

Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.

- Der Begriff "Einbringen" umfaßt im Rahmen der Erfindung
- 5 allgemein alle Verfahren, die dazu geeignet die einzubringende Verbindung, direkt oder indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfaßt. Die Einbringen kann zu einer
- 10 vorübergehenden (transienten) Präsenz besagter Verbindung führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen) oder induzierbaren. Einführen umfaßt beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.
- 15 In den im Rahmen der Erfindung zum Einsatz kommenden rekombinanten Expressionskassetten steht ein Nukleinsäuremolekül (beispielsweise kodierend für ein BII-Protein) in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem gewebespezifischen Promotor, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der
- 20 Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist d.h. natürlicherweise nicht mit derselben kombiniert vorkommt. Die erfindungsgemäßigen rekombinanten Expressionskassetten können optional weitere genetische Kontrollelemente umfassen.
- 25 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung des besagten Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der rekombinanten Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt
- 30 ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare,
- 35 ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare. Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die
- 40

Herstellung einer rekombinanten Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymeschnittstellen oder eines Signalpeptides haben.

Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen.

Bevorzugt kann die rekombinante Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer rekombinanten Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen der Promoter - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor ein endogenes BI1-Gen plaziert wird, und so die Expression des BI1-Proteins steuert. Analog kann auch die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz (z.B. kodierend für ein BI1-Protein) derart hinter einen endogenen Promotor plaziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu rekombinanten Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

Unter einem "gewebespezifischen Promotor, der im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist" sind im Rahmen dieser Erfindung allgemein solche Promotoren zu verstehen, die geeignet sind eine rekombinante Expression einer Nukleinsäuresequenz mindestens in einem pflanzlichen Gewebe zu gewährleisten oder zu erhöhen, mit der Maßgabe, dass

a) besagtes pflanzliches Gewebe ausgewählt ist aus allen pflanzlichen Geweben mit Ausnahme der Blattepidermis, und

- 5 b) die rekombinante Expression unter Kontrolle des besagten Promotors in besagtem pflanzlichen Gewebe mindestens das fünffache, bevorzugt mindestens das zehnfache, besonders bevorzugt mindestens das einhundertfache der Expression in der pflanzlichen Blattepidermis beträgt.

Dem Fachmann sind zahlreiche Promotoren bekannt, die diesen Anforderungen genügen. Insbesondere geeignet sind gewebespezifische Promotoren, wie beispielsweise, jedoch nicht 10 einschränkend Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Stengel, Wurzeln, Knollen oder Samen.

- a) Als Samen spezifische Promotoren bevorzugt sind zum Beispiel die Promotoren des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331) und Legumin B4 (LeB4; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Baumlein H et al. (1992) Plant J 2(2):233-9; 20 Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), USP (unknown seed protein; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), Napins (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), Saccharosebindeproteins (WO 00/26388), Oleosins (WO 98/45461), oder der Bce4- 25 Promoter aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die 30 eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des 35 Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.
- 40 b) Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Promotor des Patatin Gens (GenBank Acc.-No.: A08215), den Patatin Promotor Klasse I B33-Promotor (GenBank Acc.-No.: X14483) oder den Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel. Insbesondere

bevorzugt ist der Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 29. Knollen-spezifische Promotoren sind im Rahmen der Erfindung insbesondere zum Erzielen einer Resistenz gegen *Phytophthora infestans* geeignet. Da obligat-biotrophe Pilze nur Blätter befallen, ist eine Aktivität im epidermalen Knollengewebe unerheblich.

- 5 c) Blütenspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder den Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).
- 10 d) Antheren-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den  $\gamma$ -Zein Promotor.
- 15 e) Ährenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der in US 6,291,666. Ähren-spezifische Promotoren sind insbesondere zur Vermittlung einer Resistenz gegen Fusarium vorteilhaft.
- 20 f) Mesophyll-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Promotor des Weizen Germin 9f-3.8 Gens (GenBank Acc.-No.: M63224) oder der Gerste GerA Promotor (WO 02/057412). Besagte Promotoren sind insbesondere vorteilhaft, da sie sowohl mesophyll-spezifisch und pathogen-induzierbar sind. Ferner geeignet ist der mesophyll-spezifische Arabidopsis CAB-2 Promotor (GenBank Acc.-No.: X15222), sowie der Zea mays PPCZml Promotor (GenBank Acc.-No.: X63869). Insbesondere bevorzugt sind die Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 30, 31 oder 32.

30 Die in den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluß auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten

Streßfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstreß, Abscisinsäure (Lam E & Chua NH (1991) J Biol Chem 266(26):17131-17135) und Hitzestreß (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genet 217(2-3):246-53) beschrieben.

5

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116,

10 Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für

15 Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

20

Die rekombinante Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte rekombinante Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen.

25 Auch am 3'-Ende der rekombinant zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die rekombinant zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im

30 Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopaline-Synthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promoter eines BI1-Gens gegen einen der bevorzugten gewebespezifischen Promoter ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter

Umständen induzierbare Entfernung der rekombinanten Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine rekombinante Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluß auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten, Vektoren oder rekombinanten Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- 15 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon® inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques. 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die  $\beta$ -Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).
- c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
- d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.
- Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor

wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

5

Die Einführung einer erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann 10 vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die rekombinanten Expressionskassetten enthalten sind. Die rekombinante Expressionskassette kann in den Vektor (zum Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene 15 Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektiert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

20

Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der rekombinante Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert.

25

Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der rekombinanten Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

30

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird.

35

Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods Enzymol 185:527-537; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 40 42:205-225).

So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch,

- zum Beispiel mit Polyethylenglykol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen
- 5 erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhause et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiol 91:694-701).
- 15 Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die
- 20 Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.
- 25 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes durchgeführt werden. Die Agrobacterium-vermittelte
- 30 Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).
- 35 Werden Agrobakterien verwendet, so ist die rekombinante Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und
- 40 die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden rekombinanten Expressionskassette verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobakteria und ist zum Beispiel das *nptII* Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f; Clontech Laboratories, Inc. USA). Weitere zur Expression in Pflanzen geeignet Promotoren sind beschrieben (Rogers et al. (1987) Methods Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich im Prinzip für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches

Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel für geeignete Selektionsmarker sind oben 5 genannt. Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Sproß und 10 Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprößlinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) 15 Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet. Die erhaltenen Pflanzen können in der üblichen Weise gezüchtet und/oder gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die 20 genomische Integration stabil und vererblich ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Verfahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten, Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Streßresistenz oder 25 eine andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM (2000) J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft 30 Polypeptidsequenzen kodierend für B11 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38,  
35 b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindesten 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 aufweisen, und  
40 c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 umfassen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen kodierend für die erfindungsgemäßen neuen Polypeptidsequenzen kodierend für BI1-Proteine. Bevorzugt sind 5 die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 oder 37, die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz und die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Expressionskassetten, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen umfassen. In den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten ist die Nukleinsäuresequenz kodierend für das BI1-Protein aus Gerste mit mindestens einem 15 genetischen Kontrollelement nach obiger Definition derart verknüpft, das die Expression (Transkription und ggf. Translation) in einem beliebigen Organismus - bevorzugt in Pflanzen - realisiert werden kann. Dazu geeignete genetische Kontrollelemente sind oben beschrieben. Die rekombinanten 20 Expressionskassetten können auch weitere Funktionselementen gemäß obiger Definition enthalten. Die insertierte Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein aus Gerste kann in sense- oder antisense-Orientierung in die Expressionskassette insertiert sein, und damit zu Expression 25 von sense- oder antisense-RNA führen. Erfindungsgemäß sind auch rekombinante Vektoren, die die rekombinanten Expressionskassetten beinhalten.
- 30 "Rekombinant" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich 35 entweder
- a) die BI1 Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der BI1 Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte 40 genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer 5 Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch 10 teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende 15 Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des BI1-Promotors mit dem entsprechenden BI1-Gen - wird zu einer rekombinanten Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird.

20 Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen 25 Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint 30 prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen. Als rekombinante Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition.

35 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, rekombinanten Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei rekombinanten pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.- 40 , und rekombinantes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Weiterhin wird ein Nukleinsäuremolekül, das antisense zu der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist, ein monoklonaler, spezifisch an das erfindungsgemäße Polypeptide bindender Antikörper und ein Fungizid, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure, den erfindungsgemäßen Vektor, insbesondere einen infektiösen, z.B. viralen erfindungsgemäßen Vektor, das erfindungsgemäße Polypeptide in einer zur Auftragung auf Pflanzen geeigneten Form enthält, z.B. verkapselt oder in einem infektiösen, vorzugsweise zur Übertragung von Nukleinsäuren oder Expression von Genen in einer Zelle geeigneten Organismus, wie ein Agrobacterium oder ein Virus.

In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung eines BI-1 codierenden Nukleinsäuremoleküls oder eines BI-1 Proteins zur Herstellung einer Pathogen-resistanten Pflanze, vorzugsweise zur Herstellung einer gegen Pilze resistenten Pflanze oder zur Herstellung eines dies bewirkenden Fungizids oder zur Bekämpfung oder Behandlung von mit Pathogenen befallenen oder durch Pathogene bedrohten Pflanzen.

20

#### Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
- 25 2. SEQ ID NO: 2 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
- 30 3. SEQ ID NO: 3 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
4. SEQ ID NO: 4 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
- 35 5. SEQ ID NO: 5 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Tabak.
6. SEQ ID NO: 6 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Tabak.
- 40 7. SEQ ID NO: 7 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Reis.

8. SEQ ID NO: 8 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Reis.
9. SEQ ID NO: 9 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Raps.  
5
10. SEQ ID NO: 10 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Raps.
- 10 11. SEQ ID NO: 11 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Soja.
- 15 12. SEQ ID NO: 12 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Soja.
13. SEQ ID NO: 13 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Soja.  
15
14. SEQ ID NO: 14 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Soja.  
20
15. SEQ ID NO: 15 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Weizen.  
25
16. SEQ ID NO: 16 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Weizen.
17. SEQ ID NO: 17 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Mais.  
30
18. SEQ ID NO: 18 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Mais.  
35
19. SEQ ID NO: 19 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Weizen.
20. SEQ ID NO: 20 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Weizen.  
40
21. SEQ ID NO: 21 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Mais.  
45
22. SEQ ID NO: 22 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Mais.

23. SEQ ID NO: 23 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.

5 24. SEQ ID NO: 24 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.

25. SEQ ID NO: 25 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.

10 26. SEQ ID NO: 26 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.

15 27. SEQ ID NO: 27 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.

28. SEQ ID NO: 28 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.

20 29. SEQ ID NO: 29 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den Patatin Promotor aus Kartoffel.

30. SEQ ID NO: 30 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den Germin 9f-3.8 Promotor aus Weizen.

25 31. SEQ ID NO: 31 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den Arabidopsis CAB-2 Promotor

30 32. SEQ ID NO: 32 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den PPCZm1 Promotor aus Mais

33. SEQ ID NO: 33 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pUBiBI-1

35 34. SEQ ID NO: 34 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pLol14UbiBI-1

40 35. SEQ ID NO: 35 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pOXoBI-1

36. SEQ ID NO: 36 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pLo114OXoBI-1

37. SEQ ID NO: 37: Nukleinsäuresequenz kodierend für BI-1 Protein aus Weizen
- 5 38. SEQ ID NO: 38: Aminosäuresequenz kodierend für BI-1 Protein aus Weizen
39. SEQ ID NO: 39: Nukleinsäuresequenz für PEN1 (= ROR2) aus Gerste
- 10 40. SEQ ID NO: 40: Aminosäuresequenz kodierend für PEN1 (= ROR2) aus Gerste
41. SEQ ID NO: 41: Nukleinsäuresequenz für PEN1 (= ROR2) aus Arabidopsis thaliana
- 15 42. SEQ ID NO: 42: Aminosäuresequenz kodierend für PEN1 (= ROR2) aus Arabidopsis thaliana
- 20 43. SEQ ID NO: 43: Nukleinsäuresequenz kodierend für SNAP34 aus Gerste
44. SEQ ID NO: 44: Aminosäuresequenz kodierend für SNAP34 aus Gerste
- 25 Abbildungen

1. Fig. 1a-d: Vergleich von Proteinsequenzen verschiedener BI-1 Proteine aus Pflanzen. AtBI-1: Arabidopsis; BnBI-1: Brassica napus (Raps); GmBI2: Glycine max (Soja; Variante 1); GmBI3: Glycine max (Soja; Variante 2); HVBI-1: Hordeum vulgare (Gerste); NtBI-1: Nicotiana tabacum (Tabak); OsBI-1: Oryza sativa (Reis); TaBI11: Triticum aestivum (Weizen, Variante 1); TaBI18: Triticum aestivum (Weizen, Variante 2); TaBI5 neu: Triticum aestivum (Weizen, Variante 3); ZmBI14: Zea mays (Mais; Variante 1); ZmBI16: Zea mays (Mais; Variante 2); ZmBI33: Zea mays (Mais; Variante 3); ZmBI8: Zea mays (Mais; Variante 4); Consensus: Aus dem Alignment abgeleitete Konsensussequenz.
- 30 40 2. Fig. 2: Vektorkarte für Vektor pUbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI-1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind

- ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
3. Fig. 3: Vektorkarte für Vektor pLO114UbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 10 4. Fig. 4: Vektorkarte für Vektor pOxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 15 5. Fig. 5: Vektorkarte für Vektor pLO114OxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 20 6. Fig. 6: Vergleich der Proteinssequenzen von BI-1 Proteinen aus Gerste (*Hordeum vulgare*, GenBank Acc.-No.: CAC37797), Reis (*Oryza sativa*, GenBank-Acc.-No.: Q9MBD8), *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: Q9LD45) und Mensch (*Homo sapiens*, GenBank Acc.-No.: AAB87479). Schwarzhinterlegte Aminosäuren sind identisch in allen Arten. Grau hinterlegte Aminosäuren sind nur in Pflanzen identisch. Balken zeigen die vorausgesagten sieben Transmembrandomänen in HvBI-1 an.
- 25 7. Fig. 7: BI-1 Expression in resistenten und suszeptiblen Gersten-Linien (cDNA Gelblot-Analyse): cDNAs wurde mittels RT-PCR ausgehend von Gesamt-RNA synthetisiert. Gesamt-RNA wurde aus suszeptibler Gersten-Linie Pallas, resisterter Gersten-Linie BCPM1a12 und resisterter Gersten-Linie BCPmlo5 zum Zeitpunkt 0 (d.h. unmittelbar vor Inokkulation), sowie jeweils 1, 4 und 7 Tage nach Inokkulation mit *Bgh* und parallel dazu aus nicht-infizierten Kontrollpflanzen (Ø) gewonnen. Die RT-PCR für BI-1 wurde unter Verwendung von 20 Zyklen ausgeführt (s.u.). Die eingesetzte RNA-Menge (0.5 µg) wurde zusätzlich durch rRNA-Färbung mit Ethidiumbromid in Gelen kontrolliert. Wiederholung der Experimente ergab vergleichbare Resultate.

8. Fig. 8: *BI-1* wird im Mesophyllgewebe exprimiert (cDNA Gelblot-Analyse). RT-PCR wurde ausgehend von RNA isoliert aus Pallas (P) und BCPMLa12 (P10) (24 h nach Inokulation mit *BghA6*) durchgeführt. Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden abaxiale epidermale Streifen (E, inoculierte Positionen der Blätter) vom Mesophyll und der adaxialen Epidermis (M) separiert. *Ubiquitin 1 (Ubi)* wurde als Marker einer gewebeunspezifischen Genexpression verwendet. RT-PCR wurde unter Verwendung von 30 Zyklen durchgeführt.

10

9. Fig. 9: *BI-1* Expression wird während chemischer Resistenzinduktion reprimiert.

15

(A) Chemisch induzierte Resistenz in der Gersten-Linie Pallas gg. *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* (*Bgh*). Gersten Primärblätter wurden mit 2,6-Dichloroisonicotinsäure (DCINA) behandelt und zeigten weniger Mehltau-Pustulen als entsprechende unbehandelte Kontrollpflanzen.

20

(B) RNA und cDNA Blots. RNA (10 µg) wurde 0, 1, 2 und 3 Tage nach Bodenbehandlung (soil drench treatment; dpt) mit DCINA bzw. der Kontrolle (Trägersubstanz) und zusätzlich 1 und 4 Tage nach Inokulation (dpi, entspricht 4 bzw. 7 dpt) analysiert. RT-PCR (*Ubi*, *BI-1*) wurde unter Verwendung von 20 Zyklen realisiert. Wiederholung führte zu vergleichbaren Ergebnissen (siehe Beispiel 2).

30

Als Kontrolle wurde BCI-4 eingesetzt. BCI-4 ist ein DCINA-induziertes Gen (Besser et al. (2000) Mol Plant Pathol. 1(5): 277-286) und ein Mitglied der Barley Chemically (=BTH) Induced- Genfamilie.

35

10. Fig. 10: Überexpression von *BI-1* induziert Supersuszeptibilität.

40

(A) Durchschnittliche Penetrationseffizienz von *Bgh* in 6 unabhängigen Experimenten mit *Bgh* auf Gersten-Linie Ingrid. PE von *Bgh* war signifikant ( $p<0.01$ , Students t-Test) erhöht in Zellen, die mit *pBI-1* transformiert (bombardiert) wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (*pGY1*). bombardiert wurden.

(B) Die Penetrationseffizienz von *Bgh* auf Zellen die mit einem antisense-*BI-1* Konstrukt (*pasBI-1*) bombardiert wurden,

war nicht-signifikant ( $p>0.05$ ) vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (pGY1). bombardiert wurden.

5 Die Säulen geben jeweils den Mittelwert der einzelnen Experimente wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

10 11. Fig. 11: Überexpression von BI-1 induziert Bruch der mlo5-vermittelten Penetrationsresistenz.

15 Penetrationseffizienz von Bgh wurde in 3 bis 4 unabhängigen Experimenten mit Bgh auf den Gersten Linien Ingrid-mlo5 bzw. Pallas-mlo5 bewertet. PE durch Bgh war signifikant ( $p<0.05$ ) erhöht in Zellen, die mit pBI-1 transformiert (bombardiert) wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (pGY1). bombardiert wurden. Die Säulen geben jeweils den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

20 12. Fig. 12: BI-1 Expression wird durch toxische Kulturfiltrate aus Bipolaris sorokiniana induziert.

25 Northern-Blots (10 µg Gesamt-RNA) mit RNA aus Ingrid (I) und BCIngrid-mlo5 (I22). RNA wurde 0, 24, 48 und 72 h nach Injektion der toxischen Kulturfiltrate von Bipolaris sorokiniana (T) bzw. Wasser (W) isoliert. BI-1 mRNAs wurde auf Nylonmembranen nach stringenten Waschen detektiert. BI-1: Detektion von BAX Inhibitor 1 mRNA; Ubi: Detektion von Ubiquitin 1; Asprot: Detection der Aspartatprotease mRNA; hat: Stunden nach Behandlung ("h after treatment")

30 13. Fig. 13: BI-1 Überexpression bricht Nicht-Wirtsresistenz von Gerste (cv. Manchuria) gegen Blumeria graminis f.sp. tritici. Penetrationsraten wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

### Beispiele

#### Allgemeine Methoden:

- 5 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen,
- 10 Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al.
- 15 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhrt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al.
- (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

20

#### Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

- Die Gerstensorten Ingrid, Pallas und die rückgekreuzte Linie *BCPmla12*, *BCPml05* und *BCIngrid-mlo5* (I22) wurde von Lisa Munk, 25 Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben (Kølster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907).
- 30 Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8cm) in Fruhstorfer Erde vom Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken oder -kammern bei 18°C und 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 35 5000 lux (50 bzw. 60  $\mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$  Photonenflussdichte) 5 bis 8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an Primärblättern durchgeföhrten wurden, waren diese vollständig entwickelt.

Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente wurden die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C,

Verminderung der *BI1* Expression 1 bis 3 Tage nach chemischer Behandlung (Fig. 9B).

Beispiel 3: RNA-Extraktion

5

Gesamt RNA wurde aus 8 bis 10 primären Blattsegmenten (Länge 5 cm) mittels "RNA Extraction Buffer" (AGS, Heidelberg, Germany) extrahiert. Dazu wurden die zentrale Primärblattsegment von 5 cm Länge geerntet und in flüssigem Stickstoff in Mörsern

10 homogenisiert. Das Homogenisat wurde bis zur RNA-Extraktion bei -70°C gelagert. Aus dem tiefgefrorenen Blattmaterial wurde mit Hilfe eines RNA-Extraktions-Kits (AGS, Heidelberg) Gesamt-RNA extrahiert. Dazu wurden 200 mg des tiefgefrorenen Blattmaterials in einem Mikrozentrifugenröhrenchen (2 mL) mit 1,7 mL RNA-

15 Extraktionspuffer (AGS) überschichtet und sofort gut durchmischt. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform wurde erneut gut gemischt und bei Raumtemperatur 45 min auf einem Horizontalschüttler bei 200 U/min geschüttelt. Anschließend wurde zur Phasentrennung 15 min bei 20000 g und 4°C

20 zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein neues Mikrozentrifugenröhrenchen überführt und die untere verworfen. Die wässrige Phase wurde erneut mit 900 µL Chloroform gereinigt, indem 3 mal für 10 sec homogenisiert und erneut zentrifugiert (s.o.) und abgehoben wurde. Zur Fällung der RNA wurde dann

25 850 µL 2-Propanol hinzugegeben, homogenisiert und für 30 bis 60 min auf Eis gestellt. Im Anschluß daran wurde für 20 min zentrifugiert (s.o.), vorsichtig der Überstand dekantiert, 2 mL 70 %iges Ethanol (-20°C) hinzu pipettiert, durchmischt und erneut 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann wiederum

30 dekantiert und das Pelet vorsichtig mit einer Pipette von Flüssigkeitsresten befreit, bevor es an einem Reinluftarbeitsplatz im Reinluftstrom getrocknet wurde. Danach wurde die RNA in 50 µL DEPC-Wasser auf Eis gelöst, durchmischt und 5 min zentrifugiert (s.o.). 40 µl des Überstandes wurden als 35 RNA-Lösung in ein neues Mikrozentrifugenröhrenchen überführt und bei -70°C gelagert.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA-Lösung 1:99 (v/v) mit destilliertem Wasser verdünnt und die Extinktion (Photometer DU 7400, Beckman) bei 260 nm gemessen ( $E_{260\text{ nm}} = 1$  bei 40 µg RNA/mL). Gemäß der errechneten RNA-Gehalte wurden die Konzentrationen der RNA-Lösungen anschließend mit DEPC-Wasser auf 1 µg/µL angeglichen und im Agarosegel überprüft.

nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.

- 5 Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde echter Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) Hereditas 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLU Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in 10 Klimakammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidien/mm<sup>2</sup>.
- 15 Die Inokulation erfolgte auf primäre Blätter von Gerstenpflanzen mit nachfolgenden Konidien-Dichten: 5 Konidien/ mm<sup>2</sup> bei chemischer Induktion von Resistenz und makroskopischer Auswertung des Induktionserfolges, 50 Konidien/ mm<sup>2</sup> bei 20 Genexpressionsstudien und 150 Konidien/ mm<sup>2</sup> bei Überprüfung der Genttransformation mit transformierten Blattsegmenten. Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 25 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm (soweit nicht anders angegeben).

Beispiel 2: Modulation der *BII* Expression mit DCINA

- 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA, Syngenta AG, Basel, Schweiz; 30 als 25% (w/w) Formulierung) wurde auf 4-Tage alte Gerstenschößlinge der Sorte Pallas mittels Bodenbewässerung ("soil drench") in einer Endkonzentration von 8 mg/l Bodenvolumen appliziert. Die verwendete Suspension wurde mit Leitungswasser angesetzt. Als Kontrolle diente eine 35 Bodenbewässerung mit dem Trägermaterial (benetzbares Puder "wettable powder"). Nach drei Tagen wurden die Pflanzen mit *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (5 Konidien/ mm<sup>2</sup>) infiziert. Pflanzen mit chemisch induzierter Resistenz (CIR) wiesen ca. 70% weniger 40 Mehltaukolonien auf als die entsprechenden Kontrollpflanzen, die nur mit der Trägersubstanz behandelt wurden (Fig. 9A).

Northern Blot und RT-PCT Blots wurden zur Bestimmung der *BII* Transkriptmengen durchgeführt und zeigten eine überraschende

Zur Überprüfung der RNA-Konzentrationen im horizontalen Agarosegel (1 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer mit 0,2 µg/mL Ethidiumbromid) wurde 1 µL RNA-Lösung mit 1 µL 10 x MOPS, 1 µL Farbmarker und 7 µL DEPC-Wasser versetzt, nach Ihrer Größe bei 120 V Spannung im Gel in 1 x MOPS-Laupuffer über 1,5 h aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Eventuelle Konzentrationsunterschiede der RNA-Extrakte wurden mit DEPC-Wasser ausgeglichen und die Anpassung erneut im Gel überprüft.

10

Beispiel 4: Klonierung der BI1 cDNA Sequenz aus Gerste

Der Volllängenklon von hvBI1 (GenBank Acc.-No.: AJ290421) umfaßt am 3'-Ende zwei Stopp-Codons und am 5'-Ende ein potentielles Start-Codon. Der ORF überspannt 247 Aminosäuren und zeigt die höchste Sequenzhomologie zu einem BI1-Gen aus Reis, Mais, Brassica napus und Arabidopsis thaliana (jeweils 86% Identität auf Nukleotidebene) sowie einem humanen BI1-Homolog (53% Ähnlichkeit) (Fig. 1 und 6). Die Aminosäuresequenz von hvBI1 umfaßt sieben potentielle Transmembrandomänen mit einer Orientierung des C-Terminus im Cytosol.

Nachfolgende Konstrukte wurden hergestellt:

25 a) Amplifikation eines 478 bp Fragment der Gerste BI1 cDNA (GenBank Acc.-No.: AJ290421)

BI1-sense 5'-atggacgccttctactcgacctcg-3'  
BI1-antisense 5'- gccagagcaggatcgacgcc-3'

30 b) Amplifikation eines 513 bp Ubi cDNA Fragment (GenBank Acc.-No.: M60175)

UBI-sense 5'-ccaagatgcagatcttcgtga-3'  
UBI-antisense 5'-ttcgcgcataggtaaaagagca-3'

c) Amplifikation eines 871 bp Volllängen BI1 Leserahmens

40 BI1VL sense 5'-ggattcaacgcgagcgcaggacaagc-3'  
BI1VL antisense 5'-gtcgacgcggtgacggtatctacatg-3'

Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T mittels T-Überhang-Ligation ligiert und dienten als Ausgangsplasmide für die Herstellung von Sonden (z.B. für Northern-Blot) bzw. dsRNA.

Die einzelnen Konstrukte trugen die Bezeichnung pGEMT-BI1 ,  
pGEMT-BI1VL(240) und pGEMT-UBI.

Das BI1-Volllängenprodukt wurde aus pGEMT in die SalI  
5 Schnittstelle des pGY-1 vektors (Schweizer, P., Pokorny, J.,  
Abderhalden, O. & Dudler, R. (1999) Mol. Plant-Microbe Interact.  
12, 647-654) unter Verwendung der SalI-Schnittstelle in pGEMT  
und mittels der dem BI1VL antisense Primer angefügten SalI-  
Schnitstellen umkloniert. Vektoren mit sense (pBI-1) und  
10 antisense Orientierung (pasBI-1) wurden isoliert und  
resequenziert. Die Vektoren enthalten die BI-1 Sequenz unter  
Kontrolle des CaMV 35S Promotors.

15 Beispiel 5: Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion  
(RT-PCR)

Zum Nachweis von niedrigen Transkriptmengen wurde eine semi-  
quantitative RT-PCR unter Verwendung des "OneStep RT-PCR Kit"  
(Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt. Dabei wurde RNA  
20 (Isolation s.o.) zuerst in cDNA übersetzt (Reverse  
Transkription) und in einer anschließenden PCR-Reaktion mit  
spezifischen Primern die gesuchte cDNA amplifiziert. Um die  
Ausgangsmenge an Matrizen RNA abzuschätzen, wurde die  
Amplifikation während der exponentiellen Phase (nach 20 Zyklen)  
25 unterbrochen um Unterschiede in der Ziel-RNA wiederzuspiegeln.  
Die PCR Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt,  
denaturiert, auf Nylonmembranen geblottet und mit spezifischen,  
nicht-radioaktiv-markierten Sonden unter stringenten  
Standardbedingungen detektiert. Hybridisierung, Waschschritte  
30 und Immunodetektion erfolgten wie unter "Northern Blot"  
beschrieben. Für die einzelnen Reaktionen (25 µL-Ansatz) wurden  
unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden,  
Deutschland) zusammengegeben:

35 1000 ng Gesamt-RNA einer bestimmten Probe  
0,4 mM dNTPs,  
jeweils 0,6 µM sense- und antisense-Primer  
0,10 µL RNase-Inhibitor  
1 µL Enzymmix in 1x RT-Puffer

40 Die cDNA-Synthese (reverse Transkription) erfolgte für 30 min  
bei 50°C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 15  
min bei 95°C inaktiviert, was zugleich Aktivierung der DNA-  
Polymerase und Denaturierung der cDNA bewirkt. Anschließend

folgt eine PCR gemäß nachfolgendem Programm: 1 min mit 94 °C; 25 Zyklen mit 1 min mit 94 °C; 1 min mit 54°C und 1 min mit 72°C; abschließend 10 min mit 72°C. Dann Lagerung bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung. Die PCR-Produkte wurden im 1xTBE-Agarosegel  
5 mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Für die einzelnen Ansätze wurden mit den oben angegebenen Primer-Paaren amplifiziert.

Beispiel 6: Northern-Blot Analyse

- 10 Zur Vorbereitung des Northern-Blottings wurde die RNA im Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Ein Teil RNA-Lösung (entsprechend 10 µg RNA) wurde dazu mit gleichem Volumen Probenpuffer (mit Ethidiumbromid) gemischt, 5 min bei 94°C denaturiert, 5 min auf Eis gestellt, kurz zentrifugiert und  
15 aufs Gel aufgetragen. Das 1 x MOPS-Gel (1,5 % Agarose, *ultra pure*) enthielt 5 Volumenprozent konzentrierte Formaldehydlösung (36,5 % [v/v]). Die RNA wurde bei 100 V 2 h lang aufgetrennt und anschließend geblottet.
- 20 Das Northern-Blotting erfolgte als aufwärtsgerichteter RNA-Transfer im Kapillarstrom. Das Gel wurde dazu zunächst 30 min in 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) geschwenkt und zurechtgeschnitten. Ein Whatmanpapier wurde so vorbereitet, dass es auf einer horizontalen Platte auflag und  
25 auf 2 Seiten in eine Wanne mit 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) ragte. Auf dieses Papier wurde das Gel aufgelegt, wobei nicht bedeckte Teile des Whatmanpapiers mit einer Plastikfolie abgedeckt wurden. Das Gel wurde dann mit einer positiv geladenen  
30 Nylonmembran (Boehringer-Mannheim) luftblasenfrei abgedeckt, wonach die Membran wiederum mit saugfähigem Papier in mehreren Lagen etwa 5 cm hoch bedeckt wurde. Das saugfähige Papier wurde noch mit einer Glasplatte und einem 100 g Gewicht beschwert. Das Blotting erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Membran  
35 wurde kurz in A. bidest. geschwenkt und zur RNA-Fixierung mit einer Lichtenergie von 125 mJ im Crosslinker (Biorad) UV-Licht bestrahlt. Die Überprüfung des gleichmäßigen RNA-Transfers auf die Membran erfolgte auf der UV-Lichtbank.
- 40 Zur Detektion von Gersten mRNA wurden 10 µg Gesamt-RNA aus jeder Probe über ein Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillartransfer auf eine positiv-geladene Nylonmembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem DIG-Systeme nach Herstellerangaben unter Verwendung von Digoxigenin-markierten

antisense-RNA Sonden (wie beschrieben in Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47:739-748).

Herstellung der Sonden: Zur Hybridisierung mit den zu detektierenden mRNAs wurden mit Digorygenin oder Fluoreszein markierte RNA Sonden hergestellt. Diese wurden durch *in vitro* Transkription eines PCR-Produktes mittels einer T7 oder SP6 RNA Polymerase mit markierten UTPs erstellt. Als Vorlage für die PCR gestützte Amplifikation dienten die oben beschriebenen Plasmidvektoren pGEMT-BI1 , pGEMT-UBI. Je nach Orientierung des Inserts wurden unterschiedliche RNA-Polymerasen zur Herstellung des antisense-Stranges herangezogen. Die T7-RNA-Polymerase wurde für pGEMT-BI1 verwendet, die SP6-RNA-Polymerase für pGEMT-UBI. Das Insert der einzelnen Vektor wurde über PCR mit flankierenden Standard-Primern (M13 fwd und rev) amplifiziert. Die Reaktion lief dabei mit folgenden Endkonzentrationen in einem Gesamtvolumen von 50 µL PCR-Puffer (Silverstar) ab:

M13-fwd: 5'-GTAAAACGACGCCAGTG-3'  
20 M13-Rev: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

10 % Dimethylsulfoxid (v/v)  
je 2 ng/µL Primer (M13 forward und reversed)  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
25 0,2 mM dNTPs,  
4 Units Taq-Polymerase (Silverstar),  
2 ng/µL Plasmid-DNA.

Die Amplifikation verlief in einem Thermocycler (Perkin-Elmar 30 2400) temperaturgesteuert mit nachfolgendem Temperaturprogramm: 94°C für 3 min; 30 Zyklen mit 94°C für 30 sek, 58°C für 30 sek und 72°C für 1,2 min; 72°C für 5 min; anschließend Kühlung bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung. Der Erfolg der Reaktion wurde im 1 %igen Agarosegel überprüft. Die Produkte wurden anschließend 35 mit einem "High Pure PCR-Product Purification Kit" (Boehringer-Mannheim) aufgereinigt. Man erhielt etwa 40 µL Säuleneluat, das erneut im Gel überprüft und bei -20°C gelagert wurde.

Die RNA Polymerisation, die Hybridisierung und die Immuno-detection wurden weitestgehend nach Angaben des Herstellers 40 des Kits zur nicht-radioaktiven RNA-Detektion durchgeführt (DIG System User's Guide, DIG-Luminescence detection Kit, Boehringer-Mannheim, Kogel et al. (1994) Plant Physiol 106:1264-1277). 4 µL gereinigtes PCR-Produkt wurden mit 2 µL Transskriptionspuffer,

2 µl NTP-Markierungsmix, 2 µl-NTP-Mix und 10 µl DEPC-Wasser versetzt. Anschließend wurden 2 µL der T7-RNA-Polymeraselösung zu pipettiert. Die Reaktion wurde dann 2 h bei 37°C durchgeführt und anschließend mit DEPC-Wasser auf 100 µL aufgefüllt. Die RNA-Sonde wurde im Ethidiumbromidgel detektiert und bei -20°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurden die Membranen zunächst 1 h bei 68°C in 2 x SSC (Salt, Sodiumcitrate), 0,1 % SDS-Puffer (Natriumdodecylsulfat) geschwenkt, wobei der Puffer 2 bis 3 mal erneuert wurde. Die Membranen wurden anschließend an die Innenwand auf 68°C vorgeheizter Hybridisierungsröhren angelegt und 30 min mit 10 mL *Dig-Easy*-Hybridisierungspuffer im vorgeheizten Hybridisierungsofen inkubiert. Währenddessen wurden 10 µL Sondenlösung in 80 µL Hybridisierungspuffer bei 94°C für 5 min denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Zur Hybridisierung wurde die Sonde dann in 10 mL 68°C warmem Hybridisierungspuffer überführt, und der Puffer in der Hybridisierungsröhre durch diesen Sondenpuffer ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte dann ebenfalls bei 68°C über Nacht. Vor Immundetektion von RNA-RNA Hybriden wurden die Blots stringent zweimal für jeweils 20 min in 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 x SSC bei 68°C gewaschen. Zur Immunodetektion wurden die Blots zunächst zweimal für 5 min bei RT in 2 x SSC, 0,1 % SDS geschwenkt. Anschließend erfolgten 2 stringente Waschschritte bei 68°C in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS für je 15 min. Die Lösung wurde anschließend durch Waschpuffer ohne Tween ersetzt. Es wurde 1 min geschüttelt und die Lösung durch Blocking-Reagenz ausgetauscht. Nach weiteren 30 min Schütteln wurden 10 µL Anti-Fluoreszein-Antikörperlösung hinzugefügt und weitere 60 min geschüttelt. Es folgten zwei 15 minütige Waschschritte in Waschpuffer mit Tween. Die Membran wurde anschließend 2 min in Substratpuffer äquilibriert und nach Abtropfen auf eine Kopierfolie überführt. Auf der "RNA-Seite" der Membran wurde dann ein Gemisch aus 20 µL CDP-Star™ und 2 mL Substratpuffer gleichmäßig verteilt. Im Anschluß wurde die Membran mit einer zweiten Kopierfolie abgedeckt und an den Rändern mit Hitze luftblasenfrei und wasserdicht verschweißt. Die Membran wurde dann in einer Dunkelkammer für 10 min mit einem Röntgenfilm bedeckt und dieser anschließend entwickelt. Je nach Stärke der Lumineszenzreaktion wurde die Belichtungszeit variiert.

Wenn nicht extra gekennzeichnet waren die Lösungen im Lieferumfang des Kits enthalten (*DIG-Luminescence detection Kit*,

- Boehringer-Mannheim). Alle anderen wurden aus folgenden Stammlösungen durch Verdünnung mit autoklaviertem, destilliertem Wasser hergestellt. Alle Stammlösungen wurden, wenn nicht anders spezifiziert, mit DEPC (wie DEPC-Wasser) angesetzt und anschließend autoklaviert.
- DEPC-Wasser: Destilliertes Wasser wird über Nacht bei 37°C mit Diethylpyrokarbonat (DEPC, 0,1 %, w/v) behandelt und anschließend autoklaviert
- 10 x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (Morpholin-3-propansulfonsäure), 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH mit 10 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt
- 15 x SSC (Natriumchlorid-Natriumzitrat, *Salt-Sodiumcitrate*): 3 M NaCl, 0,3 M triNatriumcitrat x 2 H<sub>2</sub>O, pH mit 4 M HCl auf pH 7,0 eingestellt.
- 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat, *Sodiumdodecylsulfate*) Natriumdodecylsulfat (w/v), ohne DEPC
- RNA-Probenpuffer: 760 µL Formamid, 260 µL Formaldehyd, 100 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL), 80 µL Glycerol, 80 µL Bromphenolblau (gesättigt), 160 µL 10 x MOPS, 100 µL Wasser.
- 25 x Waschpuffer ohne Tween: 1,0 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl; ohne DEPC, mit NaOH (fest, ca. 77 g) und 10 M NaOH auf pH 7,5 einstellen.
- Waschpuffer mit Tween: aus Waschpuffer ohne Tween mit Tween (0,3 %, v/v)
- 30 x Blockingreagenz: 50 g Blockingpulver (Boehringer-Mannheim) in 500 mL Waschpuffer ohne Tween suspendieren.
- Substratpuffer: 100 mM Tris (Trishydroxymethylamino-methan), 150 mM NaCl mit 4 M HCl auf pH 9,5 einstellen.
- 35 x Farbmarker: 50 % Glycerol (v/v), 1,0 mM EDTA pH 8,0, 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v).

Eine BI1 Expression wurde wie beschrieben mit RT-PCR und cDNA Gelblots untersucht und ergab, dass BI1 überwiegend im Mesophyllgewebe von Blättern exprimiert wird, während Ubiquitin

konstitutiv gleichmäßig in Epidermis und Mesophyll exprimiert wird (Fig. 8).

Ferner ist eine Expression von BI1 als Reaktion auf Behandlung  
5 der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von Bipolaris  
sorokiniana zu beobachten. Primärblätter der Gerste zeigen  
typische nekrotische Flecke (leaf spot blotch symptoms) nach  
Behandlung der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von  
Bipolaris sorokiniana (durchgeführt wie bei Kumar et al. 2001  
10 beschrieben). Die Blattnekrosen waren erkennbar 48 h nach  
Behandlung. Der beobachtete Gewebebeschaden war in der Bgh-  
resistenten Linie BCIngrid-mlo5 (I22) deutlicher ausgeprägt als  
in der Elterlinie Ingrid (Mlo-Genotype, Kumar et al. 2001). Die  
15 Expression von BI1 korreliert 72 h nach Behandlung (hat) mit der  
Ausprägung der Blattnekrosen (Fig. 12).

Beispiel 7:

Die zur stabilen, mesophyll-spezifischen Überexpression wird der  
20 Oxalat-Oxidase Promoter (germin 9f-2.8) aus Weizen eingesetzt.  
In Gerste ist die entsprechende Oxalat-Oxidase Expression  
Mesophyll-spezifisch, schwach konstitutiv und Pathogen-responsiv  
(Gregersen PL et al. (1997) Physiol Mol Plant Pathol 51: 85-97).  
Er kann deshalb zur Mesophyll-spezifischen Expression von BI1  
25 genutzt werden. Zur Kontrolle wird HvBI1 unter Kontrolle des  
Mais-Ubiquitinpromoters (Christensen AH et al. (1992) Plant Mol  
Biol 18:675-689) oder des Reis-Aktinpromoters überexprimiert  
(Zhang W et al. (1991) Plant Cell 3:1155-1165). Eingesetzt  
werden nachfolgende Konstrukte:

- 30 a) pUbIBI-1 (SEQ ID NO: 33; für transiente Gerstentransformation  
und Weizentransformation mit Partikel Bombardement.  
Expression von BI-1 unter Kontrolle des Mais Ubiquitin  
Promotors).
- 35 b) pLo114UbIBI-1 (SEQ ID NO: 34; erhalten durch Umlonierung  
der Ubi/BI-1 Expressionscassette als EcoR1-Fragment aus  
pUbIBI-1 in pLo114-GUS-Kan; Binärer Vektor für transiente  
Gerstentransformation mit *A. tumefaciens*)
- 40 c) pOXoBI-1 (SEQ ID NO: 35; Mesophyllspezifischer TaGermin 9f-  
2.8 Promoter vor BI1 zur Weizentrafo über  
Partikelbombardement.

## d) pLo1140XoBI-1 (SEQ ID NO: 36)

Es werden Wildtypgerste und Weizen sowie *mlo*-Gerste transformiert, vermehrt und geselbstet. Die Transformation von 5 Gerste und Weizen erfolgt wie beschrieben (Repelin A et al. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183): Dazu werden Kalli aus unreifen Weizen- (bzw. Gersten-) embryonen über biolistischen Gentransfer mit Mikroprojektilen transformiert. Dabei werden pUC basierte Vektoren zusammen mit Vektoren die 10 Selektionsmarker tragen kotransformiert. Anschließend werden die Embryonen auf Selektionsmedium kultiviert und regeneriert. Gerste wird mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Dabei wird ein binärer Vektor auf Basis von pCambia\_1301 eingesetzt. Unreife Embryonen von Gerste werden mit 15 *A. tumefaciens* cokultiviert, selektiert und anschließend regeneriert (Repelin A et al. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183; Horvath H et al. (2003) Proc Natl. Acad Sci USA 100: 365-369; Horvath H et al. (2002) in Barley 20 Science, eds. Slafer, G. A., Molina-Cano, J. L., Savin, R., Araus, J. L. & Romagosa, J. (Harworth, New York), pp. 143-176; Tingay S et al. (1997) Plant J. 11: 1369-1376).

Die transgenen (rekombinanten) Gersten- und Weizenpflanzen der T1 oder T2-Generation werden auf Resistenz gegenüber 25 hemibiotrophen und perthotrophen Erregern geprüft. Dazu werden die Blätter mit verschiedenen Pathogenen inkuliert. Als biotrophe Erreger werden Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) und Braunrost (*Puccinia hordei*) verwendet. Als Maß der Mehltauanfälligkeit wird die Pustelzahl pro Blattfläche 5-7 Tage 30 nach Inkulation mit 2-5 Konidien pro mm<sup>2</sup> Blattfläche ausgewertet (Beßer K et al. (2000) Mol Plant Pathology 1: 277-286). Als hemibiotrophe Erreger werden *Bipolaris sorokiniana* n und *Magnaporthe grisea* verwendet. Die Inkulation erfolgt wie zuvor beschrieben (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91: 127-35 133; Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12: 508-514). Als Maß für die Anfälligkeit dient die Anzahl und Größe der Blattläsionen 2 bis 6 Tage nach Sprühinkulation mit Konidien (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133; Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12:508-514; 40 Jarosch B et al. (2003) Mol Plant Microbe Inter 16:107-114.). Als perthotropher Erreger wird *Fusarium graminearum* verwendet.

Zur Bestimmung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ I-Resistenz werden Weizenähren in einem frühen Blühstadium mit einer

Makrokonidien-Suspension (ca.  $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* besprüht. Die inkontrollierten Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert.

- 5 Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Stärke der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 5, 7 und 8 Tagen evaluiert.

Zur Quantifizierung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ II-

- 10 Resistenz werden jeweils 10 - 20 µl Aliquots einer Makrokonidien-Suspension (ca.  $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* in einzelne, relativ zentral gelegene Ährchen von Weizenpflanzen injiziert. Die inkontrollierten Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C  
15 Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert. Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Ausbreitung der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 7, 14 und 21 Tagen evaluiert. Die Ausbreitung der Symptome über die Ähre (das sog. *Fusarium-Spreading*) wird als Mass für die FHB Typ II-Resistenz genommen.  
20

Vergleichsbeispiel 1: Transiente BI1 Expression in der Epidermis und Evaluation der Pilzpathogenentwicklung

- 25 Gerste cv Ingrid Blattsegmente wurden mit einer pGY-BI1 zusammen mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert. Anschließend wurden die Blätter mit Bgh inkontrolliert und das Ergebnis nach 48 h mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die  
30 Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der Pilzentwicklung aufin eben diesen Zellen beurteilt. Es wurde ein Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt, das bereits für die biolistische Einführung von DNA und RNA in epidermale  
35 Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24:895-903).

Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17,

- 40 Durchmesser 1,1 µm; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 mL autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 mL 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung

wurde mit 50%igem Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert.

- Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuß 0,3 µg Plasmid
- 5 *pGFP* (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promoters; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant-Microbe Interact* 12:647-654.), 0,7 µg Leervektor *pGY* bzw. *pGY-BI1* (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml; entsprechend 312 µg Wolframpartikel), 12,5 µl 1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (pH 10) tropfenweise unter ständigem
- 10 Mischen zusammengegeben, 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikel wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.
- 15 Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremsen. Der oben an der Kammer angebrachte Macrocarrier (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-beschichteten Wolframpartikeln (Microcarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur 35 Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (*pGFP*; Vektor auf *pUC18*-Basis, CaMV 35S-Promoter/Terminator-Kassette mit insertiertem GFP-Gen; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer, Institut für Pflanzenbiologie IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen. Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der Macrocarrier jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger Inkubation nach dem Beschuß bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm<sup>2</sup> des

Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6; *Blumeria graminis f.sp. hordei* Mehltau A6) inkuliert und für weitere 40 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Penetration ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die

- 5 Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen, die ein mit reifem Haustorium und einer Sekundärhyphae ("secondary elongating hyphae"), wurde mittels Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inkulation mit 150 Conidia/mm<sup>2</sup> ergibt eine Angriffs frequenz von ca. 50 %
- 10 der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten Zellen konnten unterschieden werden:

- 15 1. Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde als eine Zelle gewertet.
- 20 2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium enthält, wurde als eine Zelle gewertet.
- 25 3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.

- Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von Bgh wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,3 %
- 30 Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In BI1-dsRNA transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein
- 35 Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.

- 40 Die Penetrationseffizienz (Penetrationsraten) errechnet sich als Anzahl der penetrierten Zellen durch Anzahl der attackierten Zellen multipliziert mit 100.

Die Penetrationseffizienz dient der Bestimmung des Suszeptibilität von Zellen, die mit pGY-BI1 transfiziert sind im Vergleich zu Zellen die mit einer Leervektorkontrolle transformiert sind

- (Fig. 10). Es wurde beobachtet, dass die BI1 Überexpression die Penetrationshäufigkeit von Bgh signifikant erhöht (Fig. 10). In sechs unabhängigen Experimenten bewirkte die Überexpression in der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid eine signifikante Erhöhung  
5 der durchschnittlichen Penetrationseffizienz (PE) von 47 % auf 72 % (165 % der Kontrollen) bei Zellen die BI1 überexprimieren im Vergleich zu Zellen, die mit Leervektor transformiert wurden (Kontrolle) (Fig. 10).
- 10 Ferner wurden epidermale Zellen der *Bgh*-resistenten *mlo5*-Gerste mit dem BI1 Überexpressionskonstrukt pGY-1 wie oben beschrieben transient transformiert. Der *mlo5*-Genotyp in einem Pallas bzw. Ingrid Hintergrund zeigt eine geringfügige Anfälligkeit gegen Bgh. In 7 unabhängigen Experimenten wurde in Kontrollpflanzen  
15 (Transformation mit Leervektor und GFP-Vektor) eine Penetrationseffizienz von minimal 0 bis maximal 11 % gefunden. Überraschenderweise ergab eine BI1 Überexpression (pGY-BI1) eine nahezu vollständige Rekonstitution der suszeptiblen Phänotyps, d.h. es erfolgte ein nahezu kompletter Bruch der *mlo*-Resistenz.  
20 Die durchschnittliche Penetrationseffizienz von Bgh auf Ingrid-*mlo5* und Pallas-*mlo5* Blattsegmenten steigt von 4 % auf 23 %, bzw. von 6 % auf 33 % (Fig. 11). Dies bedeutet einen relativen Anstieg der Penetration auf 520 % bzw. 510 % der Kontrollen. Des Weiteren erhöhte die Überexpression von BI1 im Gerste cv  
25 Manchuria die Anfälligkeit gegen das Weizenpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* in drei unabhängigen Experimenten von 0 bis 4 % auf 19 bis 27 % (Fig. 13).

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
  - 5 a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt oder reduziert wird, und
  - 10 b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Ausgangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor besteht oder erhöht ist.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Stressfaktor ein pflanzliches Pathogen ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei der Stressfaktor ein nekrotropes oder hemibiotropes Pathogen ist.
- 25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das BI-1 Protein mindestens eine Sequenz umfasst, die eine Homologie von mindestens 50% aufweist zu mindestens einem BI1-Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - 30 a) H(L/I)KXYY,
  - b) AXGA(Y/F)XH,
  - c) NIGG,
  - d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR,
  - e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL,
  - 35 f) DP(S/G)(L/I)(I/L),
  - g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T),
  - h) YL(Y/F)LGG,
  - i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W, und
  - j) DTGX(I/V)(I/V)E.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das BI-Protein kodiert wird durch ein Polypeptid, das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
  - 5 a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 oder 38, und
  - 10 b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 oder 38 aufweisen,
  - 15 c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 oder 38 umfassen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines BII-Proteins durch rekombinante Expression des besagten BII-Proteins unter Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors realisiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend
  - 25 (a) stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.
  - 30 (b) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und
  - 35 (c) Expression besagter für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in einer Menge und für eine Zeit hinreichend um eine Stress- und/oder Pathogenresistenz in besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.  
5
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Expression des Bax Inhibitor-1 (BI-1) im Mesophyll erhöht wird.  
10
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Pflanze einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist, oder die Expression oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx mindestens in der Epidermis inhibiert oder im Vergleich zu einer Kontrollpflanze reduziert ist und/oder die Expression oder Funktion von PEN2, SNAP34 und/oder PEN1 mindestens in der Epidermis erhöht wird im Vergleich zu einer Kontrollpflanze.  
15
20. 12. Polypeptidsequenz kodierend für BI1 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38,  
25
  - b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindesten 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 aufweisen, und  
30
  - c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 umfassen.  
35
13. Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Polypeptidsequenz gemäß Anspruch 12.
40. 14. Rekombinante Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.  
45

15. Rekombinante Expressionskassette nach Anspruch 14, wobei
  - a) das BII-Protein wie in einem der Ansprüche 4, 5 oder 11 definiert ist, und/oder
  - b) der gewebespezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe der wurzel-, knollen- oder mesophyllspezifischen Promotoren.
16. Rekombinanter Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 14 oder 15.
17. Rekombinanter Organismus enthaltend mindestens eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 14 oder 15 und/oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 16.
18. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 17 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, nicht-menschlichen Tieren und Pflanzen.
19. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 17 oder 18, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuß, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und Zucchini.
20. Rekombinanter Organismus nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei der Organismus eine Pflanze ist, die zusätzlich einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist.

1

50

AtBI-1	(1)	-----MDAFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNFRQISPQVQNLK
BnBI-1	(1)	-----MDSFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNLQRQISPQVQNLK
GmBI2	(1)	-----RLQAMDAFNSFFDS-----RNRWNYDTLKNFRQISPQVQNLK
GmBI3	(1)	ITKTIRFDLSFMSMTFFFSPSSSSRSRWSYDTLKNFRQISPQVQNLK
HVBI-1	(1)	-----MDAFYSTS---SAAASGWGHDSDLKNFRQISPQVQNLK
NtBI-1	(1)	-----MESCTSFFNSQSASS-RNRWSYDSLKNFRQISPQVQNLK
OsBI-1	(1)	-----MDAFYSTSSAYGAAASGWGYDSLKNFRQISPQVQNLK
TaBI11	(1)	-----
TaBI18	(1)	-----FSGTFRNSRSDDFVLCELQRELPRCRDATLTV
TaBI5 neu	(1)	-----VAMPGR
ZmBI14	(1)	-----
ZmBI16	(1)	-----
ZmBI33	(1)	-----
ZmBI8	(1)	-----
Consensus	(1)	F S W YDSLKN R ISP VQ HLK

51

100

AtBI-1	(39)	VYLTLCCALVASAFGAYLHVWNIGGILTTIGCIGTMIWLLSCPPYEHQK
BnBI-1	(39)	VYLTLCCALVASAFGAYLHVWNIGGILTTIGCFGSMIWLLSCPPYEQQK
GmBI2	(40)	VYFTLCFAVVAAAVGAYLHVLLNIGGFLTTVACMGSSFWLLSTPPFEERK
GmBI3	(51)	VYFTLCACAVVAAVGAFHLHVWNIGGFLTTLASIGSMFWLLSTPPFEEQK
HVBI-1	(37)	VYLTLCFALASSAVGAYLHIALNIGGMLTMLACVTIAWMFSVPVYEERK
NtBI-1	(41)	VYLSLCCALVASAAGAYLHILWNIGGLLTTLGCVGSIWLMATPLYEEQK
OsBI-1	(40)	VYLTLCVALAASAVGAYLHVWNIGGMLTMLGCVGSIAWLFSPVFEERK
TaBI11	(1)	-----
TaBI18	(33)	VYVIPIVGRIKSAAGAYLHIALNIGGMLTMLACIGTIAWMFSPVYEERK
TaBI5 neu	(7)	RFRLYALPGLICRGCLPAHCPEHWRDADNARVYRNHLRDVLGASLRGE
ZmBI14	(1)	-----GSIAWLFSVPVYEERK
ZmBI16	(1)	-----WNIGVRLTMLGCIGSIDWLFSVPVYEERK
ZmBI33	(1)	-----WNIGGTLTMLGCVGSIAWLFSPVYEERK
ZmBI8	(1)	-----
Consensus	(51)	VY TLC AL ASA GAYLHV NIGG LT LGCIGSI WL S PVYEERK

101

150

AtBI-1	(89)	RLSLLFVSAVLEGASVGPLIKVAIDVDP SILITAFVGTAIAFGCFSGAAM
BnBI-1	(89)	RLSLLFLSAVLEGASVGPLIKVAVDFDPSI LITAFVGTAIAFGCFSGAAM
GmBI2	(90)	RVTLLMAASLFFQGSSIGPLIDLAIHIDPSLIFSAFVGTAIAFGCFSGAAL
GmBI3	(101)	RLSLLMASALFQGASIGPLIDLAFIAIDPGLIIGAFVATSLAFACFSVAL
HVBI-1	(87)	RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAIAFGCFSGAAI
NtBI-1	(91)	RIALLMAAALFKGASIGPLIELAIDFDPSIVIGAFVGCAVAFGCFSAAAM
OsBI-1	(90)	RFGILLAAALLEGASVGPLIKLAVDFDSSILVTAFVGTAIAFGCFCAAI
TaBI11	(1)	-----AAI
TaBI18	(83)	RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAIAFGCFSGAAI
TaBI5 neu	(57)	EVWAADGCSLLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAIAFGCFSGAAI
ZmBI14	(17)	RYWLLMAAALLEGASVGPLIKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFGCFSCAAM
ZmBI16	(30)	RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFGCFSGAAM
ZmBI33	(30)	RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFGCFSGAPW
ZmBI8	(1)	-----VIDLDSRILVTAFVGTAIAFGCFSGAAI
Consensus	(101)	R LLMAAALLEGASVGPLI LAIDFDPSILVTAFVGTAIAFGCFSGAAI

**Fig.1a**

08 SEP 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

		151	200
AtBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF	
BnBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF	
GmBI2	(140)	VARRREYLYLGGLLVSSGLSILLWLHFASSIFG-GSTALFKFELYFGLLVF	
GmBI3	(151)	VARRREYLYLGGLLSSWLSILMWLHSDSSLFG-GSIALFKFELYFGLLVF	
HVBI-1	(137)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFVTSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
NtBI-1	(141)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFVTSIFGHSS-GSMALFKFEVYFGLLVF	
OsBI-1	(140)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHST-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI11	(4)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI18	(133)	IAKRREYLYLGGLLSSG-----LTIL	
TaBI5 neu	(107)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI14	(67)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHST-GHSATSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI16	(80)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQLAASIF-GHSATSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI33	(80)	WQAR-EYLYLGGSRRGSPSCSGCSSPPPSS--ALRNSFMFEVYFGLLIL	
ZmBI8	(29)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHITS-ATFMFELYFGLLVF	
Consensus	(151)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFASSIFG S ASFMFEVYFGLLIF	
		201	250
AtBI-1	(188)	VGYMVVDTQEIIIEKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIMLKNSAD	
BnBI-1	(188)	VGYMVVDTQDIIEKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIMLKNSAD	
GmBI2	(189)	VGIVVDTQEIVERAHLGDLDDVVKHALTLFTDLAVFVRILVIMLKNSSTE	
GmBI3	(200)	VGIVVDTQEIIERAHFGDLDVVKHALTLFTDLAAIFVRILIIMLKNSSE	
HVBI-1	(186)	LGYMVYDTQEIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIIMLKNA GD	
NtBI-1	(190)	VGIIIFDTQDIIEKAHLGDLDDVVKHALTLFTDFVAVFVRILIIMLKNSAD	
OsBI-1	(189)	LGYMVYDTQEIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMLKNSAD	
TaBI11	(53)	LGYMVYDTQEIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILIIIMLKNA GD	
TaBI18	(154)	L-----	
TaBI5 neu	(156)	LGYMVYDTQEIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIILLKNAAD	
ZmBI14	(117)	LGYMVYDTQEVIERAHHG-----	
ZmBI16	(129)	LGYYVYDT-----	
ZmBI33	(127)	LG-----	
ZmBI8	(78)	LGYMFDTQEIIERAHRGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMMKNAQE	
Consensus	(201)	LGYMVYDTQEIIERAH GDMDYIKHALTLFTDFVAV VRILIIMLKNA D	
		251	300
AtBI-1	(238)	KEEKKKRRN-----GDVK-I-LYGCYRVWPL-RYLLALSIGDQTCF	
BnBI-1	(238)	KEDKKKKRRN-----D-KVRKKAK-SGCVCFKK-----KRVG	
GmBI2	(239)	RNEKKKKRND-----	
GmBI3	(250)	RNEKKKKRND--ADRPTRAQASLQ-FSLWRIHN-----LFR-CWSLV-	
HVBI-1	(236)	KSEDKKKRKG-----S-----	
NtBI-1	(240)	KEEKKKRRN---CISGYSKTL-L-NLAFSCS---TSVDLRQVCC--FG	
OsBI-1	(239)	KSEEKKRKRS-ELLFPLCT-EKTTAAIASTYYDRAALQLGF MVNTSSFA	
TaBI11	(103)	KSEDKKKRKRRS-----	
TaBI18	(155)	-----	
TaBI5 neu	(206)	KVGGQEEEEEKS-----	
ZmBI14	(135)	-----	
ZmBI16	(137)	-----	
ZmBI33	(129)	-----	
ZmBI8	(128)	KSQDEKKRK-----	
Consensus	(251)	K E KKKRR	

**Fig.1b**

08 SEP 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

		301	350
AtBI-1	(278)	H-KG-SACFTSAQVPSSDCK-----	LECCSSFHKLLFFKSL
BnBI-1	(269)	VISTDMIALVFFTCLSEQFW-----	QHTLRICVFLLVTPDCEWI
GmBI2	(249)	-----	-----
GmBI3	(288)	LVSYVFAVMVNVRISFKHLHMYLPIS-CVV-HHTLV-KKKKKKKKKKKKK	
HvBI-1	(248)	-----	-----
NtBI-1	(279)	NASD-AARLCYAAQCQCGYGGT-MVLF---PKHTIK-HACLHYIDNLRVY	
OsBI-1	(287)	FC-YGVNLLRFVVVALQILACYMTRIFL-WWSR-SKRENTSSFATNLFA	
Consensus	(301)		
		351	400
AtBI-1	(312)	VILLIASYQAKNNVGK-----	SCLNFLKCVHFRKKKKKKKK
BnBI-1	(307)	SILKLC-KLSVGS-----	
GmBI2	(249)	-----	-----
GmBI3	(335)	KKKKKXXXXXXXXXXXXX--XXXXXGVCGLRYSRHSSNH-EGSLW-PGLC-	
HvBI-1	(248)	-----	-----
NtBI-1	(322)	YLFLLPFAVLGCS-LYS-FSVMLDHLLS-RLISHIDGRNENSHRRPNLFK	
OsBI-1	(334)	FW-LMMILSPKKKK-----	
Consensus	(351)		
		401	450
AtBI-1	(348)	-----	-----
BnBI-1	(319)	-----	
GmBI2	(249)	-----	-----
GmBI3	(380)	ACIDTVH-FGCNLICANS-YNVE-FI-EK-EEEEERLIG-PIAMCRVIWFV	
HvBI-1	(248)	-----	-----
NtBI-1	(369)	TEAQL-----	
Consensus	(401)		
		451	500
GmBI3	(424)	ENT-LAV-KLLVPLCS--LAMCLL-W-MSGFLLNIFICIC--S-YIV-TS	
Consensus	(451)		
		501      512	
GmBI3	(464)	FLGLKKEKKKKK	
Consensus	(501)		

JC14 Rec'd PCT/PTO 08 SEP 2005

*THIS PAGE BLANK (USPTO)*

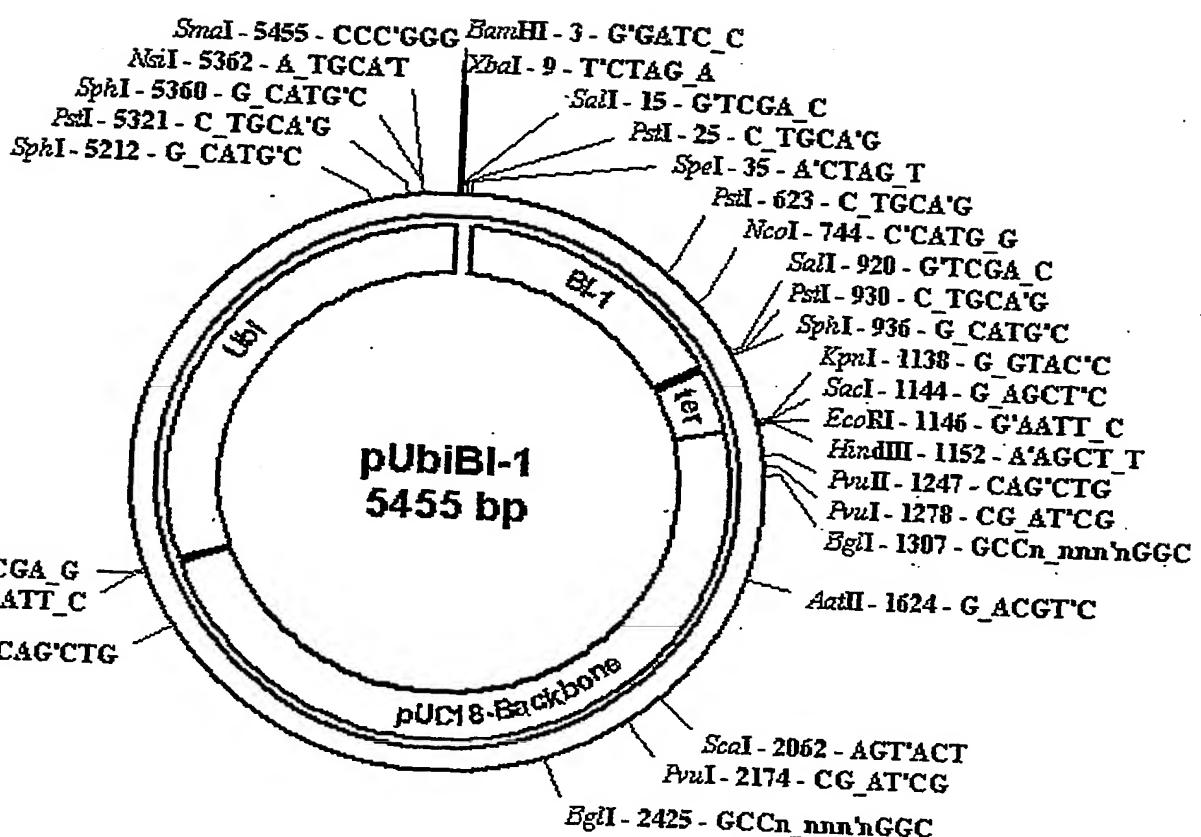
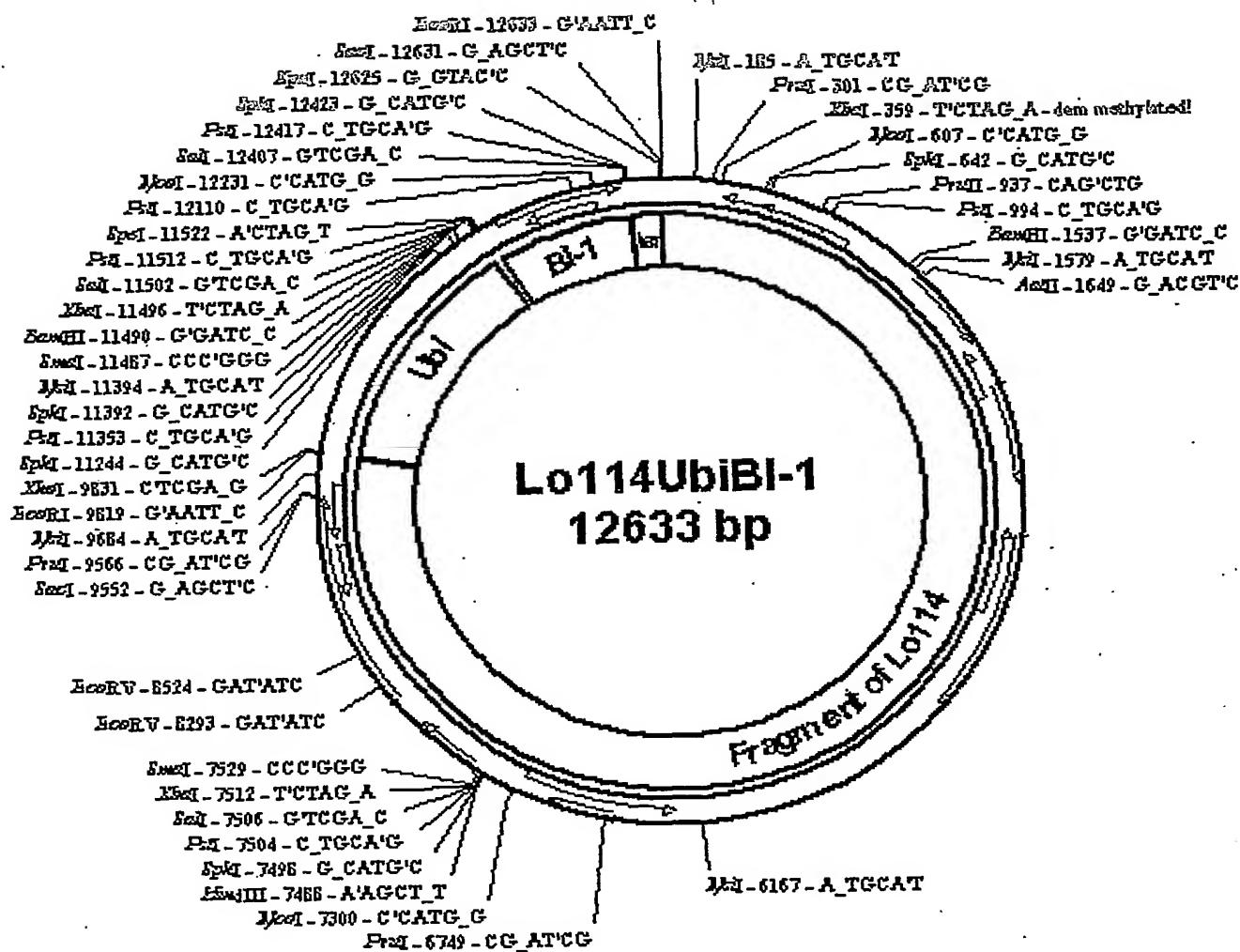


Fig. 2

100-1120-3110 03 Oct 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Fig. 3**

JEWELER REPORTS 08 SEP 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

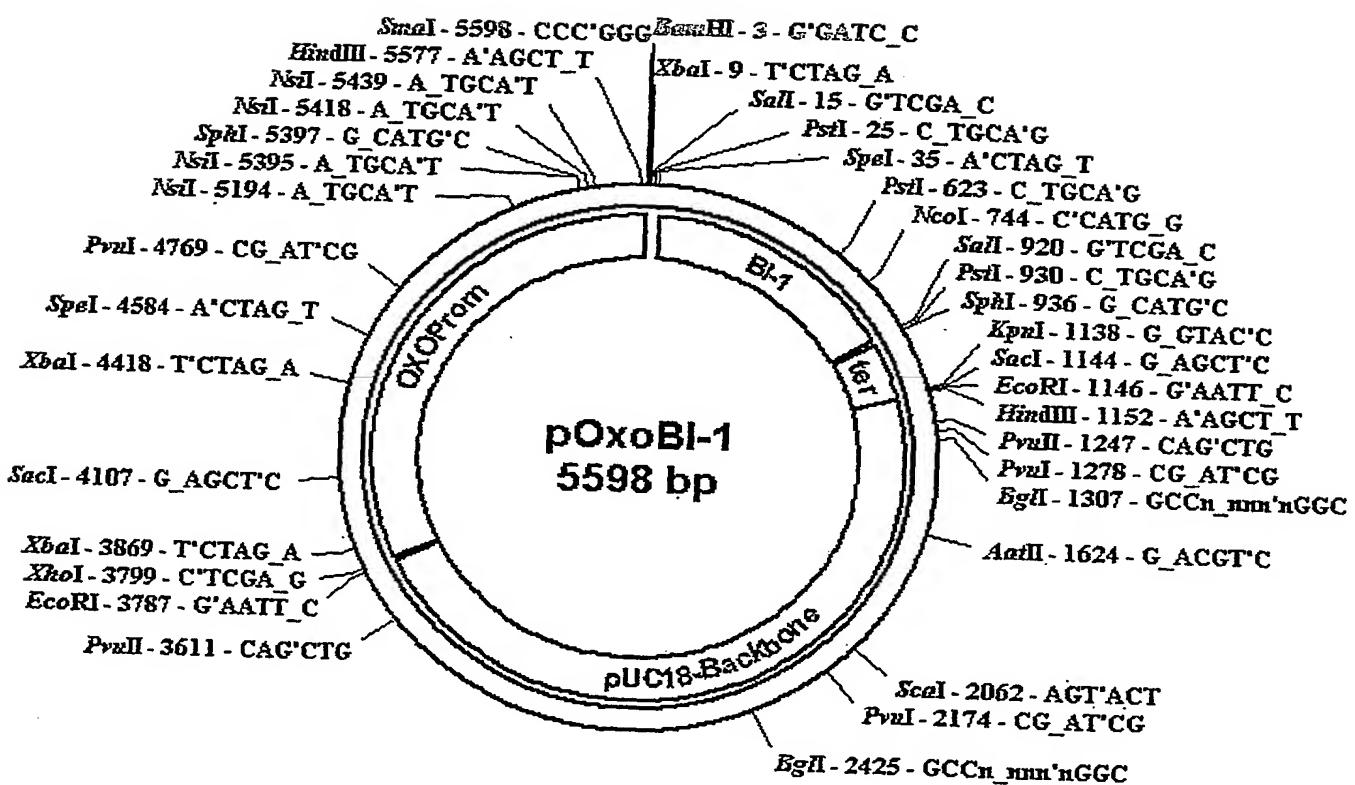


Fig. 4

JC14 Rec'd CT/PTO 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

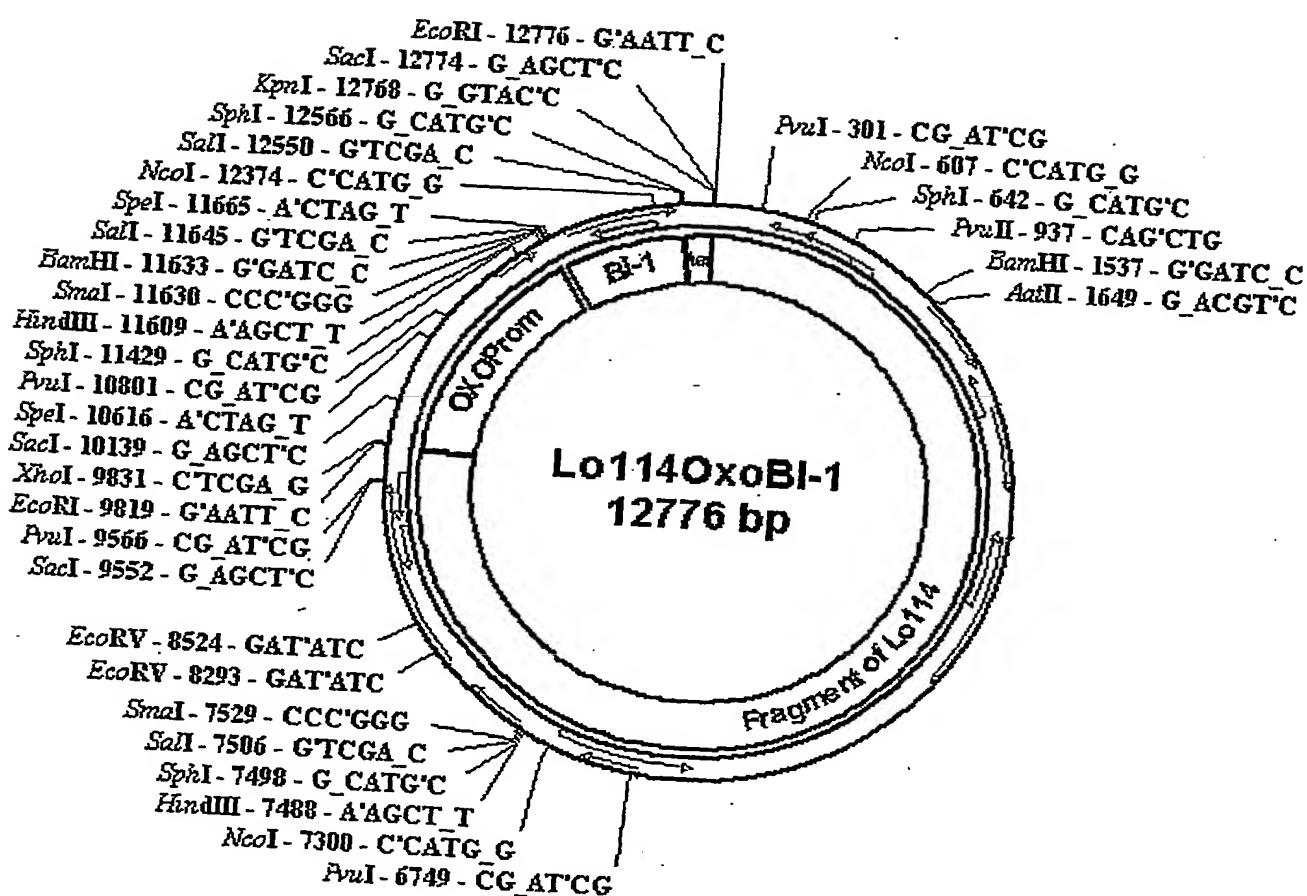


Fig. 5

ପାତ୍ର କିମ୍ବା କିମ୍ବା କିମ୍ବା କିମ୍ବା

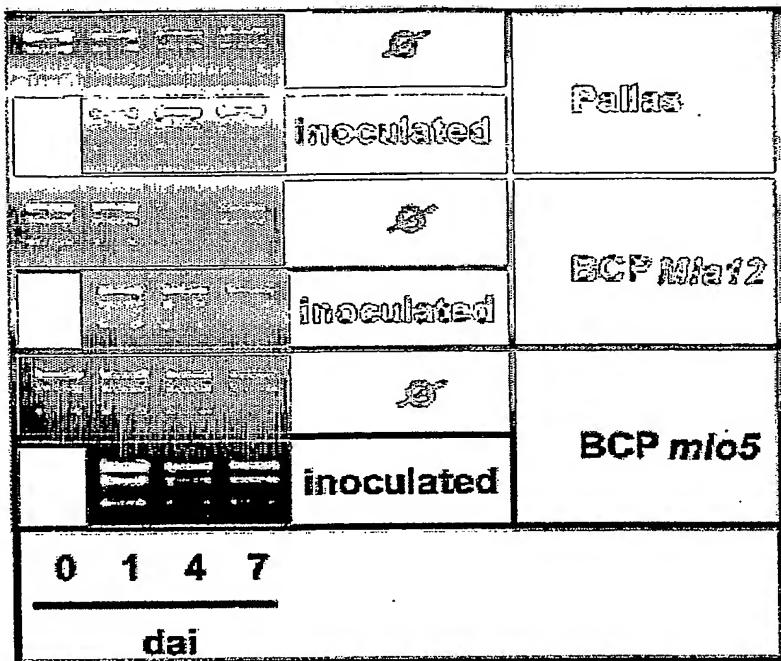
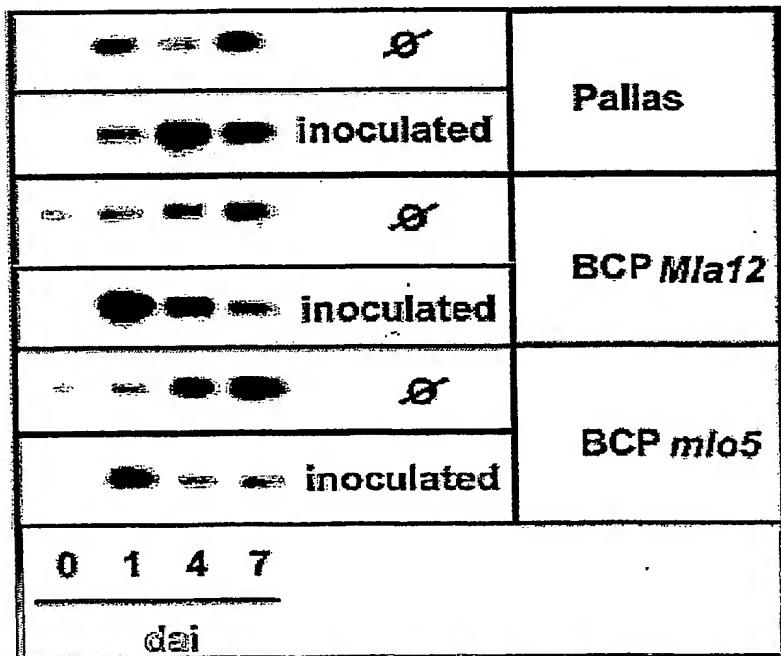
THIS PAGE BLANK (USPTO)

<i>H. vul.</i>	MDEYVSTSS---ALLSGRHHHS	57
<i>O. sat.</i>	MDAVYSTSSAYGAAASCGYH	60
<i>A. tha.</i>	MDIISFFDS-QPGSRSMYSID	59
<i>H. sap.</i>	MNIDDRKIN-----	50
<i>H. vul.</i>	LN---IGCGLILMLACVGTIAWFSVPVYEE--RKRFGLLMGAEELLEGASVGPLEKLAIDFD	113
<i>O. sat.</i>	LN---IGCGLILMLACVGSIAWLFSPVYEE--RKRFGILLAAELLEGASVGPLEKLAIDFD	116
<i>A. tha.</i>	UN---IGCGLILITIGCIGTMIWLLSCPPYEH--QKRLSLLFVSEPVLEGASVGPLEKVAIDVD	115
<i>H. sap.</i>	THFIQAGILSALGSLILMILMATHPHSHETEOKRLGLLAGFAFLTGVLGPALFCIEVN	110
<i>H. vul.</i>	PSILVTGFVGTIAIFGCFSGAIIIDEKREYLNLLGGILSSGELSILLMLOFVISIFGHSSGS	173
<i>O. sat.</i>	SSILVTAFVGTIAIFGCFTOAIVAKREYLNLLGGILSSGELSILLMLOFIASTIFGHSTGS	176
<i>A. tha.</i>	PSILITAFVGTIAIFVCFSAAGELDEKREYLNLLGGILSSGELSILLMLOFASSIFGGSASI	175
<i>H. sap.</i>	PSILPIAFVGTAMIFTCFILSALYRRESYFLFLGGILMSALSLLLLSSLGNVFFG-SIUP	169
<i>H. vul.</i>	FITTEVTEGLIIEFLGYMYDTQEIIIERAHHGDEDYIEKHAILFTDFQAVLVRVLIIEHKQA	233
<i>O. sat.</i>	FIGEVYTFGLIIEFLGYMYDTQEIIIERAHHGDEDYIEKHAILFTDFQAVLVRVLIIEHKNA	236
<i>A. tha.</i>	FKEELYEGLIEFLGVYMYDTQEIIIERAHLGDEDYWKGESELFTDFQAVFVRVLIIEHKOS	235
<i>H. sap.</i>	FQANLYVGLVVNCGFVLDTCLIIERAEHHGDDYIWHCIDLFIDFTVFRKLMNLAME	229
<i>H. vul.</i>	GDESEDKFKRKRGSS 247	
<i>O. sat.</i>	SDKSEEKKRKRRS- 249	
<i>A. tha.</i>	ADR-EEKRKRRRN- 247	
<i>H. sap.</i>	KDF---KREKK--- 237	

Fig. 6

08 SEP 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**rRNAs****BI-1****Fig. 7**

JC14 Re PCT/PTO 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/548748

WO 2004/081217

PCT/EP2004/002436

10/15

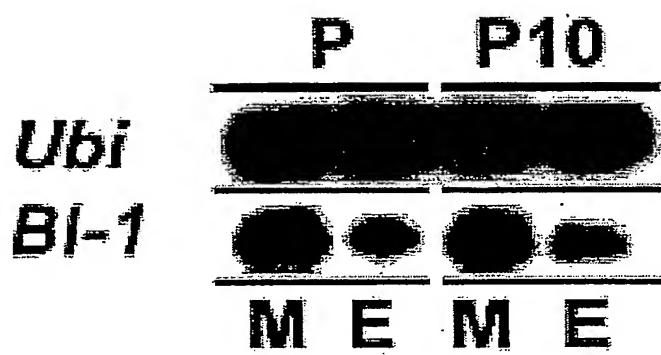


Fig. 8

100-100000000008 SEP 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

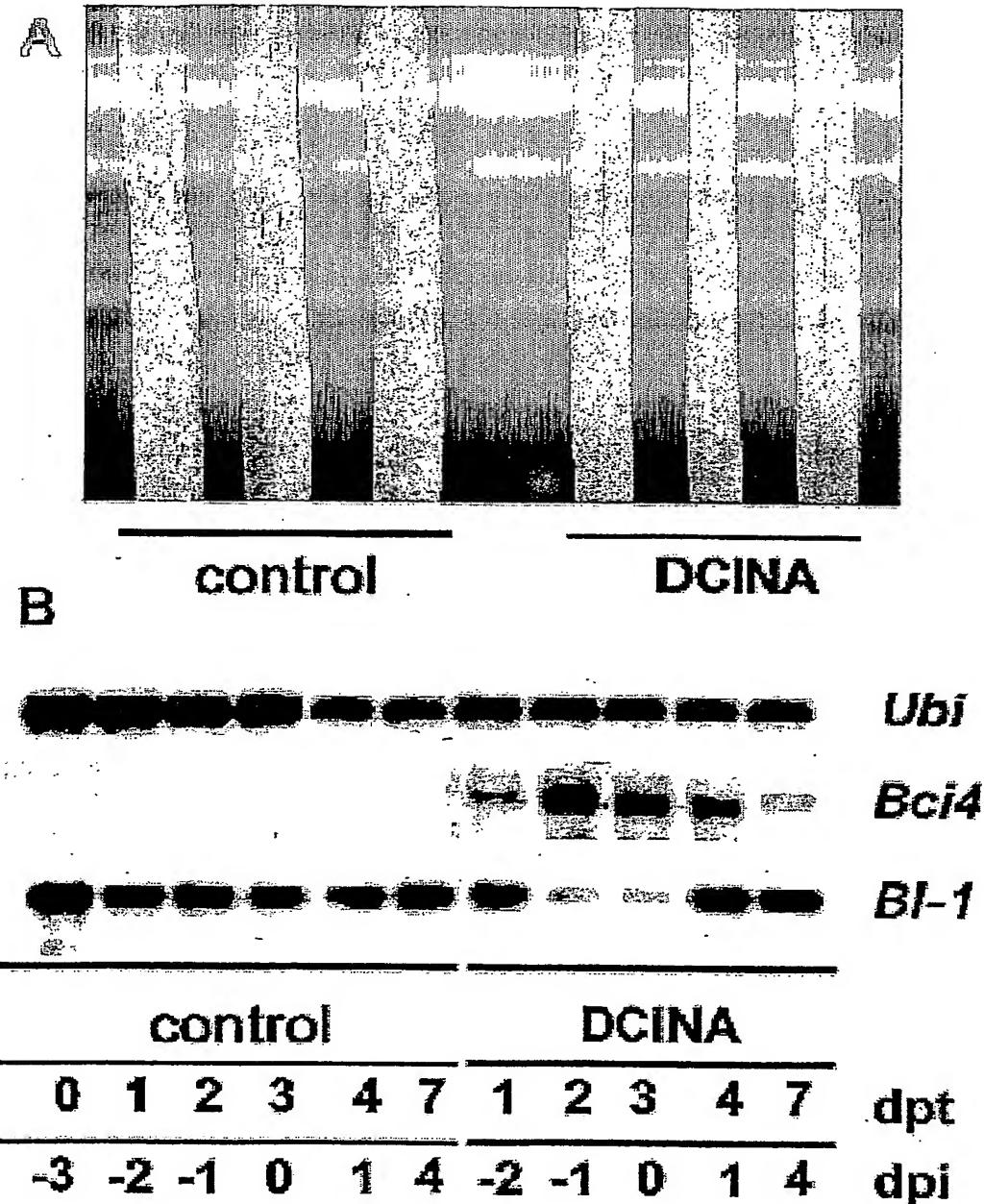


Fig. 9

JC14 REC-2 G1/P7D 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

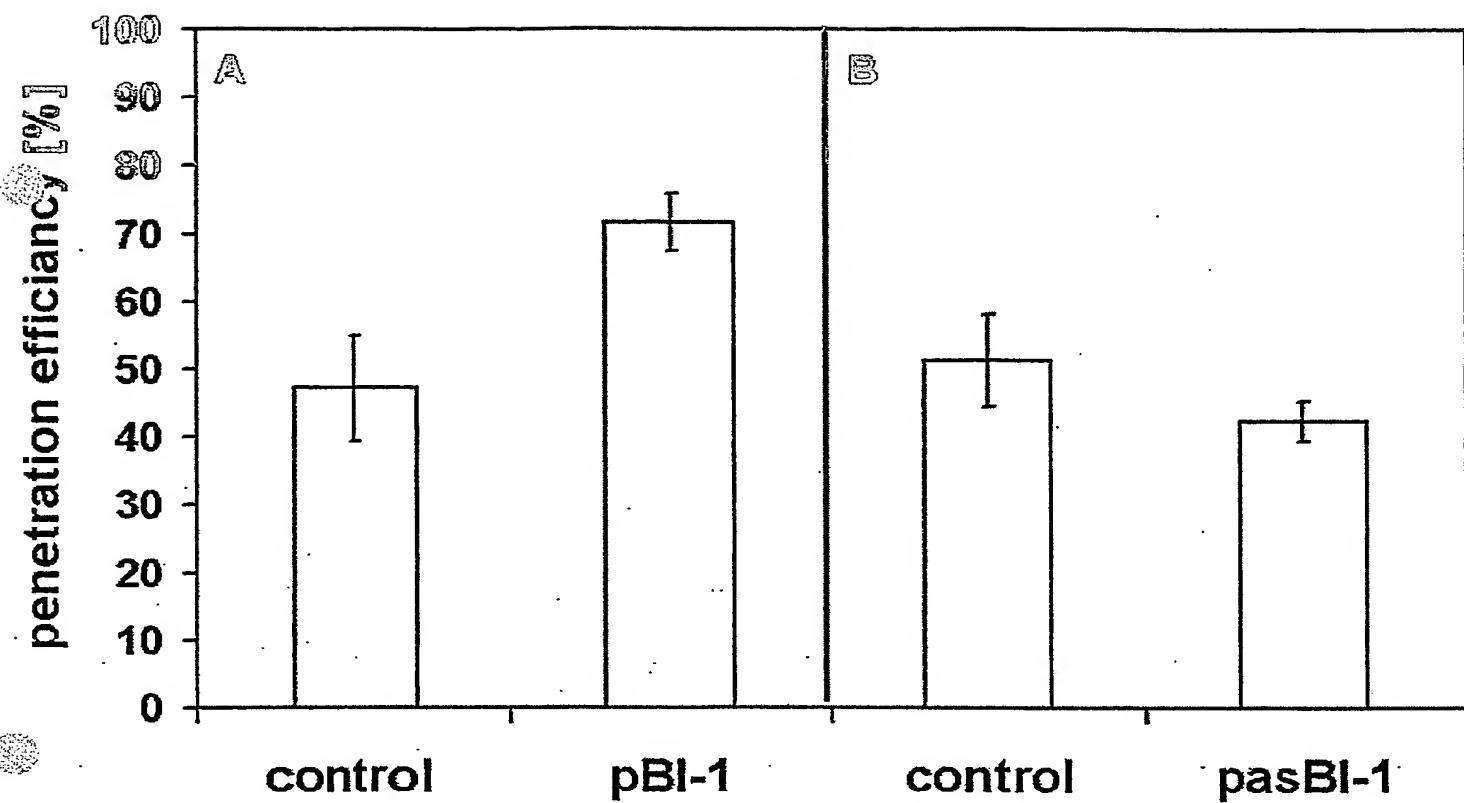


Fig.10

JC14 Re PCT/PTO 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

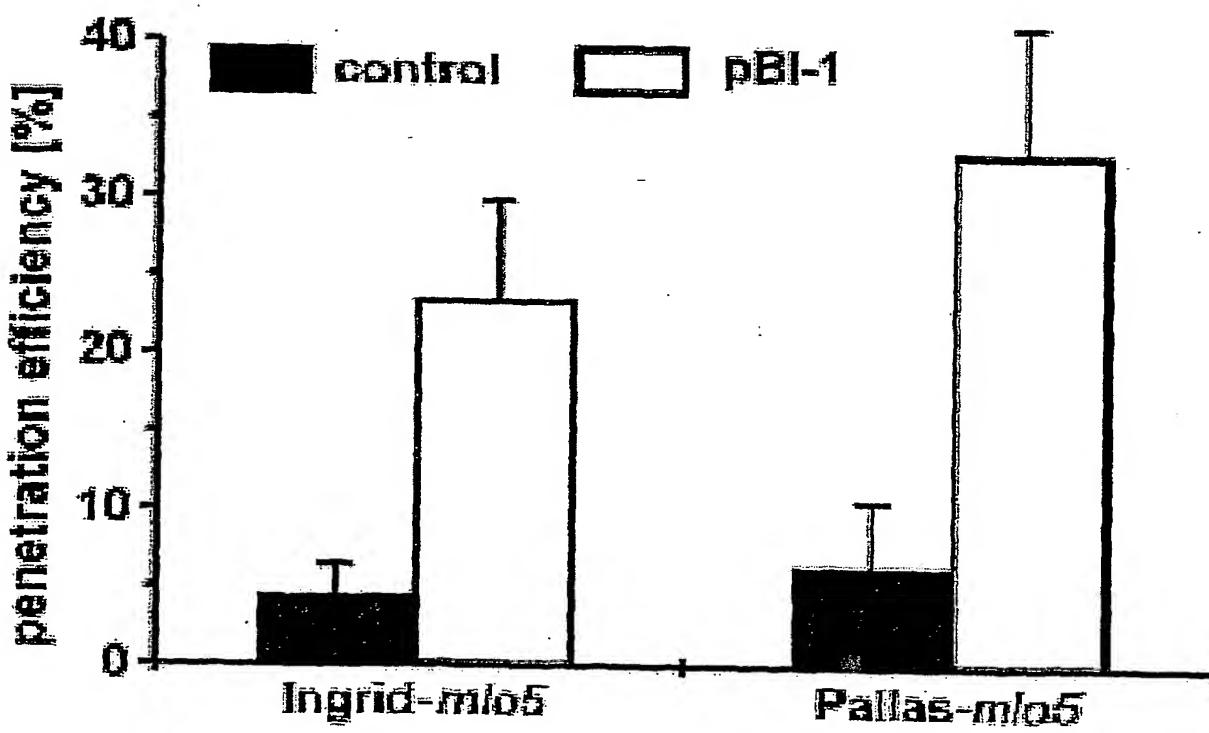


Fig.11

03 SEPT 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

	I	122	I	122	I	122	I	122	I	122	I	122	I	122
SH-T														
ASPECT														
Uef														
DNA														
	S	W	T		W	T		W	T		W	T		W
	8 hat	24 hat			48 hat			72 hat						

Fig.12

JCPA REG'D TRADE MARK 08 SEP 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

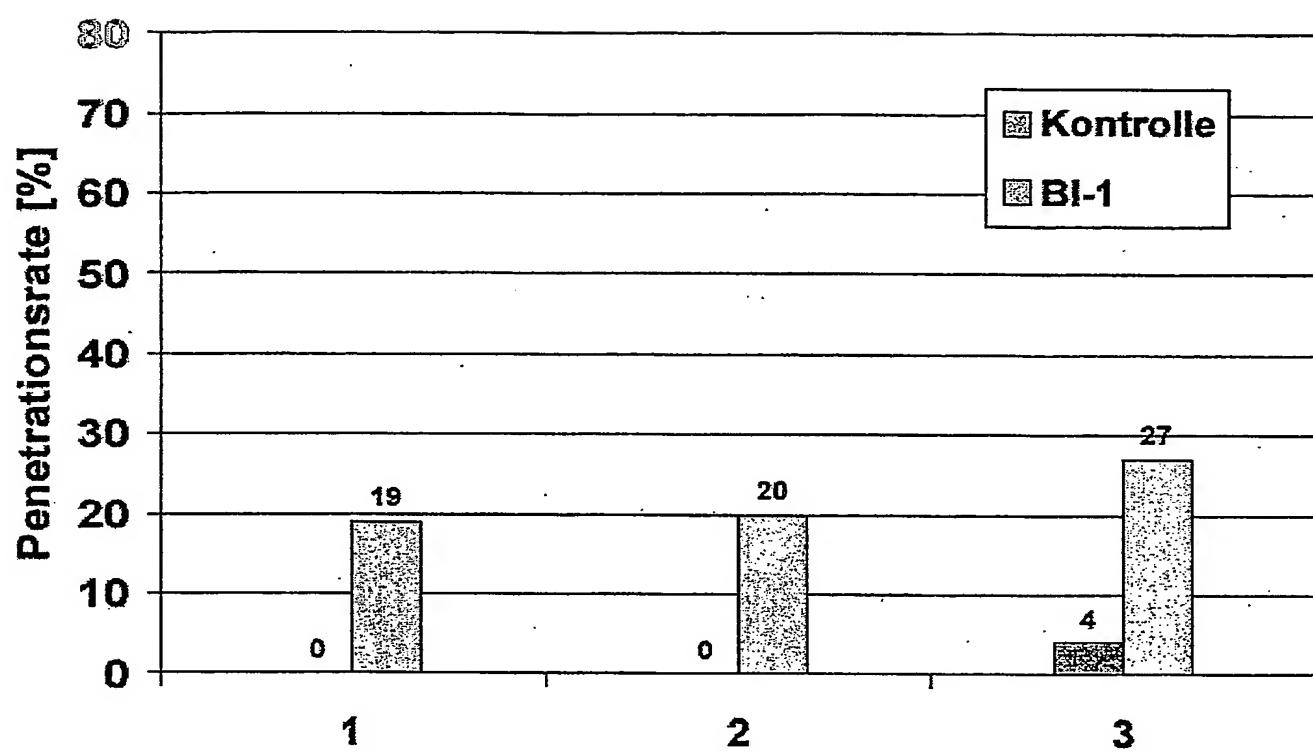


Fig.13

JC14 Rec'd CT/PTO 08 SEP 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



	180	185	190	
5	acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cat ggc gac atg gac tac atc Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile 195 200 205			624
10	aag cac gcc ctc acc ctc ttc acc gac ttt gtt gcc gtc ctc gtc cga Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg 210 215 220			672
15	gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag Val Leu Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys 225 230 235 240			720
20	aag aag agg aag agg ggg tcc tga Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser 245			744
25	<210> 2 <211> 247 <212> PRT <213> Hordeum vulgare			
30	<400> 2 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly 1 5 10 15			
35	His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser 20 25 30			
40	His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser 35 40 45			
45	Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu 50 55 60			
50	Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro 65 70 75 80			
55	Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu 85 90 95			
60	Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe 100 105 110			
65	Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe 115 120 125			
70	Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu 130 135 140			
75	Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu 145 150 155 160			
80	Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe 165 170 175			
85	Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp 180 185 190			
90	Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile 195 200 205			
95	Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg 210 215 220			
100	Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys 225 230 235 240			
105	Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser 245			

5           <210> 3  
 <211> 1067  
 <212> DNA  
 <213> *Arabidopsis thaliana*  
 10          <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(741)  
 <223> coding for BI1-protein  
 15          <400> 3  
 atg gat gcg ttc tct tcc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc      48  
 Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser  
 1               5               10               15  
 20          tgg agc tat gat tct ctt aaa aac ttc cgt cag att tct cca gcc gtt      96  
 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val  
 25          20               25               30  
 cag aat cat ctt aaa cgg gtt tat ttg acc tta tgt tgt gct ctt gtg      144  
 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val  
 35          35               40               45  
 25          gcg tct gcc ttt gga gct tac ctc cat gtg ctc tgg aat atc ggc ggt      192  
 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly  
 50               55               60  
 30          att ctt aca acg att gga tgt att gga act atg att tgg ctc ctt tca      240  
 Ile Leu Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser  
 65               70               75               80  
 35          tgt cct cct tat gaa cac caa aaa agg ctt tct ctt ctg ttt gtg tct      288  
 Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser  
 85               90               95  
 40          gct gtt ctt gaa ggt gct tct gtt ggc ccc ttg atc aaa gtg gca att      336  
 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile  
 100               105               110  
 45          gat gtt gac cca agc atc ctt atc act gca ttt gtt gga act gcg ata      384  
 Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 115               120               125  
 45          gcg ttt gtc tgt ttc tca gca gca gca atg tta gca aga cgc agg gag      432  
 Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu  
 130               135               140  
 50          tat ctc tac ctt gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tct atg cta atg      480  
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met  
 145               150               155               160  
 55          tgg ctc cag ttt gcc tct tca atc ttt ggt ggc tct gca tct atc ttt      528  
 Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe  
 165               170               175  
 60          aag ttt gag ttg tac ttt gga ctt ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg      576  
 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val  
 180               185               190  
 65          gtg gac aca caa gag att ata gaa aag gca cac ctc ggt gac atg gac      624  
 Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp  
 195               200               205  
 65          tat gta aaa cat tcg ttg acc ctt ttc act gac ttt gta gct gtg ttt      672  
 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe  
 210               215               220  
 70          gtt cggtt att ctc atc ata atg ttg aag aac tca gca gat aaa gaa gag      720  
 Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu  
 225               230               235               240

aag aag aag aaa agg aga aac tgaggggatg taaagttaaat ttaactttat 771  
 Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
 245

5 ggttgttatac gtgtgtggcc actttgaaga tattacttgt tagcactctc tattggtgac 831  
 cagacatgtt tccactaaaa aggatctgct tggggactt ctgcacaagt accatctca 891  
 gattgttaat gactcgagtg ttgttcttct tttcataaac ttttggtctt taagagttg 951  
 10 gttctactga ttgcatactt ccaagctaag aataatgtag gaaaatgata atcctgttta 1011  
 aattttctaa aatgtgtgca ttccagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1067

15 <210> 4  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

20 <400> 4  
 Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser  
 1 5 10 15

25 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val  
 20 25 30

Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val  
 35 40 45

30 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly  
 50 55 60

35 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser  
 65 70 75 80

Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser  
 85 90 95

40 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile  
 100 105 110

Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 115 120 125

45 Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu  
 130 135 140

50 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met  
 145 150 155 160

Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe  
 165 170 175

55 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val  
 180 185 190

Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp  
 195 200 205

60 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe  
 210 215 220

65 Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu  
 225 230 235 240

Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
 245

70 <210> 5  
 <211> 1160

<212> DNA  
 <213> Nicotiana tabacum

5           <220>  
 5           <221> CDS  
 5           <222> (1)...(747)  
 5           <223> coding for BII-protein

10          <400> 5  
 10       atg gag tct tgc aca tcg ttc aat tca cag tcg gcg tcg tct cgc   48  
 10       Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg  
 10        1               5               10               15  
 15       aat cgc tgg agt tac gat tct ctt aag aac ttc cgc cag atc tct ccc   96  
 15       Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro  
 15        20              25              30  
 20       ttt gtt caa act cat ctc aaa aag gtc tac ctt tca tta tgt tgt gct   144  
 20       Phe Val Gln Thr His Leu Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala  
 20        35              40              45  
 25       tta gtt gct tcg gct gga gct tac ctt cac att ctt tgg aac att   192  
 25       Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile  
 25        50              55              60  
 30       ggt ggc tta ctt acg aca ttg gga tgt gtg gga agc ata gtg tgg ctg   240  
 30       Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu  
 30        65              70              75              80  
 35       atg gcg aca cct ctg tat gaa gag caa aag agg ata gca ctt ctg atg   288  
 35       Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met  
 35        85              90              95  
 40       gca gct gca ctg ttt aaa gga gca tct att ggt cca ctg att gaa ttg   336  
 40       Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu  
 40        100             105             110  
 45       gct att gac ttt gac cca agc att gtg atc ggt gct ttt gtt ggt tgt   384  
 45       Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys  
 45        115             120             125  
 50       gct gtg gct ttt ggt tgc ttc tca gct gct gcc atg gtg gca agg cgc   432  
 50       Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Met Val Ala Arg Arg  
 50        130             135             140  
 55       aga gag tac ttg tat ctt gga ggt ctt ctt tca tct ggt ctc tct atc   480  
 55       Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile  
 55        145             150             155             160  
 60       ctt ttc tgg ttg cac ttc gcg tcc tcc att ttt ggt ggt tct atg gcc   528  
 60       Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala  
 60        165             170             175  
 65       ttg ttc aag ttc gag gtt tat ttt ggg ctc ttg gtg ttt gtg ggc tat   576  
 65       Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr  
 65        180             185             190  
 70       atc att ttt gac acc caa gat ata att gag aag gca cac ctt ggg gat   624  
 70       Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp  
 70        195             200             205  
 75       ttg gac tac gtg aag cat gct ctg acc ctc ttt aca gat ttt gtt gct   672  
 75       Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala  
 75        210             215             220  
 80       gtt ttt gtg cga ata tta atc ata atg ctg aag aat gca tcc gac aag   720  
 80       Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys  
 80        225             230             235             240  
 85       gaa gag aag aag aag agg aga aac taatgcataa gcgggttattc   767  
 85       Glu Glu Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
 85        245

aaagactctg taactctaga atctggcatt ttcttgcata taaaacttcg tagacccctcg 827  
 acaagtatgt tgtaatagt ttggtaacgc ctcagattaa gctgcgaggc tctgttatgc 887  
 5 cgcacatccaa tgtggttatg gtggcacata gatggtttg tttccgaagc ataccatcaa 947  
 ataacatgca tgtttacact atatcgataa cctacgagtg tactacttat ttctgctccc 1007  
 10 ttttgctgtg tttaggttgtt catgattgta tagttgattt tccggttatgt tagaccatct 1067  
 tctttcttga cgtttaattt ctcatattga tgggagaaat gaaaattcac accgtcgccc 1127  
 caacttggaa aagactgagg cgcaattgta gtt 1160  
 15  
 <210> 6  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana tabacum  
 20 <400> 6  
 Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg  
 1 5 10 15  
 25 Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro  
 20 25 30  
 Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala  
 35 40 45  
 30 Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile  
 50 55 60  
 Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu  
 35 65 70 75 80  
 Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met  
 85 90 95  
 40 Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu  
 100 105 110  
 Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys  
 115 120 125  
 45 Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Met Val Ala Arg Arg  
 130 135 140  
 50 Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile  
 145 150 155 160  
 Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala  
 165 170 175  
 55 Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr  
 180 185 190  
 Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp  
 195 200 205  
 60 Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala  
 210 215 220  
 65 Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
 245  
 70  
 <210> 7  
 <211> 1056

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(747)

&lt;223&gt; coding for B11-protein

&lt;400&gt; 7

10 atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg tac gga gcg gcg gcg agc 48  
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser  
1 5 10 1515 ggc tgg ggc tac gac tcg ctg aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc 96  
Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala  
20 25 3020 gtc cag tcc cac ctc aag ctc gtt tac ctg aca cta tgc gtc gcc ctg 144  
Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu  
35 40 4525 gct gcg tcg gcg gtg ggc gca tac ctg cac gtc gcc ttg aac atc ggc 192  
Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly  
50 55 6030 ggg atg ttg act atg ctc ggg tgc gtg ggg agc atc gcc tgg ttg ttc 240  
Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe  
65 70 75 8035 tcg gtg cct gtc ttt gag gag agg aag agg ttt ggg att ctc ttg gcc 288  
Ser Val Pro Val Phe Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala  
85 90 9535 gct gcc ctg ctg gaa ggg gct tca gtt ggg cct ctg atc aag ctt gct 336  
Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala  
100 105 11040 gta gac ttt gac tca agc att ctc gta aca gca ttt gtt gga act gcc 384  
Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala  
115 120 12545 att gca ttt ggg tgc ttc act tgc gct gcc atc gtt gcc aag cgt agg 432  
Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg  
130 135 14050 ctc tgg ctg cag ttt gcc gca tcc atc ttt ggc cac tcc acc ggc agc 528  
Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser  
165 170 17555 ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg 576  
Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met  
180 185 19060 gtg tat gac acg cag gag atc atc gag agg gct cac cac ggt gac atg 624  
Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met  
195 200 20565 gac tac atc aag cac gca ctc acc ctc ttc act gac ttc gtg gcc gtc 672  
Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val  
210 215 22070 ctt gtc cgg atc ctc gtc atc atg ctc aag aac gcg tct gac aag tcg 720  
Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser  
225 230 235 24070 gag gag aag aag agg aag aag agg tct tgagagcttc tcttccccgt 767  
Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser  
245

ttgcacataa gaaaaaacca ccggcgctat tgcctctacg tattatgaca gagccgact 827  
tcaactgggt tttatggtga atacaagttc ttttcattt tggtgatacg gtgtaatct 887  
5 tctcaggttt gtcgtcgtag tagcttgca aatactagca tgctacatga cacggatctt 947  
tctgtaatgg tggtcgcgtt gatcggaaacg tgaaaacaca tcttcatttg cgactaattt 1007  
gtttgcctt tggtgattga tgatgatcct ttccccaaaa aaaaaaaaaa 1056  
10  
<210> 8  
<211> 249  
<212> PRT  
15 <213> Oryza sativa  
  
<400> 8  
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser  
1 5 10 15  
20 Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala  
20 25 30  
Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu  
25 35 40 45  
Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly  
50 55 60  
30 Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe  
65 70 75 80  
Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala  
85 90 95  
35 Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala  
100 105 110  
40 Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala  
115 120 125  
Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg  
130 135 140  
45 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu  
145 150 155 160  
Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser  
165 170 175  
50 Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met  
180 185 190  
55 Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met  
195 200 205  
Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val  
210 215 220  
60 Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser  
225 230 235 240  
Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser  
245  
65  
  
<210> 9  
<211> 973  
70 <212> DNA  
<213> Brassica napus  
  
<220>

<221> CDS  
 <222> (1)...(741)  
 <223> coding for BII-protein

5	<400> 9	
	atg gat tca ttc tcg tcc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc	48
	Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser	
	1 5 10 15	
10	tgg agc tat gat tct ctc aaa aac ctc cgt cag att tct ccc tcc gtc	96
	Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val	
	20 25 30	
15	cag aat cat ctc aag agg gtt tat ctc act ctg tgt tgt gct ctc gtt	144
	Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val	
	35 40 45	
20	gcg tct gcg ttt gga gct tac ctc cac gtg ctc tgg aac ata ggt ggt	192
	Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly	
	50 55 60	
25	att ctc act acc att gga tgc ttt gga agc atg att tgg ctg ctc tcc	240
	Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser	
	65 70 75 80	
30	tgt cct cct tat gaa caa caa aag agg ctt tcc ctt ctg ttt ctg tct	288
	Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser	
	85 90 95	
35	gct gtt ctc gaa ggt gct tca gtt ggt ccc ttg atc aaa gtt gca gtt	336
	Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val	
	100 105 110	
40	gat ttt gac cca agc atc ctc atc act gcg ttt gtc gga act gcg ata	384
	Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile	
	115 120 125	
45	gcc ttt atc tgt ttc tca ggg gca gcg atg ttg gca aga cgc aga gag	432
	Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu	
	130 135 140	
50	tac ctc tac ctc gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tcc atg ctt atg	480
	Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met	
	145 150 155 160	
55	tgg ctt cag ttt gcc tct tcc atc ttt ggt ggc tct gca tcc atc ttt	528
	Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe	
	165 170 175	
60	aag ttt gag ctc tac ttt gga ctc ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg	576
	Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val	
	180 185 190	
65	gtg gac act caa gat att ata gag aag gcc cac ctc ggt gac atg gat	624
	Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp	
	195 200 205	
70	tac gtg aaa cat tcg ttg acc ctt ttc acc gat ttt gta gct gtg ttt	672
	Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe	
	210 215 220	
75	gtt cgt gtt ctc atc att atg ctg aag aac tcg gca gat aaa gaa gat	720
	Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp	
	225 230 235 240	
80	aaa aag aag agg agg aac tgagactaaa aagtgagaaaa gaaagctaaa	771
	Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn	
	245	
85	tagagtgggt gttatgtgtg tttcaaaaaaa taaaaaaagag tgggtgttat aagtacagac	831
	atgatagcgt tgggttttt tacttgttg gaacagtttt ggtaacaaca cacgttacgt	
	891	

10

attttgttat tcctcttagt gactccagat tgtgaatgga tcagtatctt gaaactgtgt 951  
 tgaaaattat cagttgggag ct 973

5

<210> 10  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> Brassica napus

10

<400> 10  
 Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser  
 1 5 10 15

15

Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val  
 20 25 30

Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val  
 35 40 45

20

Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly  
 50 55 60

25

Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser  
 65 70 75 80

Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser  
 85 90 95

30

Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val  
 100 105 110

Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 115 120 125

35

Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu  
 130 135 140

40

Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met  
 145 150 155 160

Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe  
 165 170 175

45

Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val  
 180 185 190

Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp  
 195 200 205

50

Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe  
 210 215 220

55

Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp  
 225 230 235 240

Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn  
 245

60

<210> 11  
 <211> 747

<212> DNA  
 <213> Glycine max

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(744)  
 <223> coding for BII-protein

<400> 11  
 cga ttg caa gca atg gac gcc ttc aat tcc ttc gat tca aga aac 48

Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn 1                   5                   10                   15	
cga tgg aat tac gat act ctc aaa aac ttc cgt cag att tct ccg gtc      96	
5 Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val 20               25               30	
gtg cag aat cac ctg aag cag gtt tat ttt act ctg tgt ttt gcc gtg      144	
10 Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val 35               40               45	
gtt gct gcg gct gtc ggg gct tac ctt cat gtc ctc ttg aac att ggg      192	
Val Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly 50               55               60	
15 ggt ttt ctt act aca gtg gca tgc atg gga agc agc ttt tgg tta ctc      240	
Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu 65               70               75               80	
20 tcc aca cct cct ttt gaa gag agg aag agg gtg act ttg ttg atg gcc      288	
Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala 85               90               95	
25 gca tca ctg ttt cag ggt tcc tct att gga ccc ttg att gat ttg gct      336	
Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala 100              105              110	
30 att cat atc gat cca agc ctt atc ttt agt gca ttt gtc gga aca gcc      384	
Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala 115              120              125	
ttg gcc ttt gca tgc ttc tca gga gca gct ttg gtt gct agg cgt agg      432	
Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg 130              135              140	
35 gag tac ctg tac ctt ggt ggc ttg gtt tct tct gga ttg tcc atc ctt      480	
Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu 145              150              155              160	
40 ctc tgg ttg cac ttt gct tct tcc atc ttt gga ggc tca aca gct ctc      528	
Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu 165              170              175	
45 ttt aag ttt gag ttg tac ttt ggg ctt ttg gtc ttt gta ggt tac att      576	
Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile 180              185              190	
50 gta gta gac acc caa gaa ata gtt gag agg gca cac ttg ggc gat ctg      624	
Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu 195              200              205	
55 gac tat gta aag cat gcc ttg acc ttg ttt acc gat ttg gtc gca gtt      672	
Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val 210              215              220	
ttt gtc cgg att ctt gtt att atg ttg aag aat tcg act gag agg aat      720	
Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn 225              230              235              240	
60 gag aag aaa aag aag aga aga gat tga      747	
Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asp 245	
65 <210> 12	
<211> 248	
<212> PRT	
<213> Glycine max	
70 <400> 12	
Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn 1               5               10               15	

## 12

Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val  
 20 25 30  
 Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val  
 5 35 40 45  
 Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly  
 50 55 60  
 10 Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala  
 15 85 90 95  
 Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala  
 100 105 110  
 20 Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala  
 115 120 125  
 Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg  
 130 135 140  
 25 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu  
 30 165 170 175  
 Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile  
 180 185 190  
 35 Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu  
 195 200 205  
 Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val  
 210 215 220  
 40 Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn  
 225 230 235 240  
 Glu Lys Lys Lys Arg Arg Asp  
 45 245

<210> 13  
 <211> 1510  
 50 <212> DNA  
 <213> Glycine max  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 55 <222> (1)..(777)  
 <223> coding for BI-1 protein  
  
 <400> 13  
 atc acg aaa act ata cga ttc gat tcc ttg ttt tcg atg gac act ttc  
 60 Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe 48  
 1 5 10 15  
  
 ttc aag tcc cca tct tct tct tcg aga agc cgc tgg agt tac gat  
 65 Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp 96  
 20 25 30  
  
 act ctc aag aat ttc cgc gag atc tct ccg ctc gtt cag aat cac atc  
 Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile 144  
 70 35 40 45  
  
 aaa ctg gtt tat ttt acg tta tgt tgc gct gtg gtg gct gct gtt  
 Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val 192  
 50 55 60

gga gct ttc ctt cat gtt ctg tgg aac att ggc ggt.	ttt ctc acc acg	240
Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly	Gly Phe Leu Thr Thr	
65 70 75 80		
5 ttg gct tcc att ggg agc atg ttt tgg ttg cta tct aca ccc cct ttt	Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe	288
85 90 95		
10 gaa gag caa aag agg ttg tct ctg ttg atg gct tcg gcc ctg ttt cag	Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln	336
100 105 110		
15 ggt gct tcc att gga cct ctg att gat ttg gct ttt gcc att gat cct	Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro	384
115 120 125		
20 ggc ctt atc att ggc gca ttt gtg gca act tct ttg gct ttt gct tgc	Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys	432
130 135 140		
25 ttt tct gca gta gcc tta gtt gca agg cga agg gag tac ctc tac ctt	Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu	480
145 150 155 160		
30 ggt ggt ttg ctt tct tct tgg ctt tcc att ctt atg tgg ttg cac tct	Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser	528
165 170 175		
35 tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gtg ggc tac gtt ata gta gac act caa	Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln	576
180 185 190		
40 gaa att att gaa agg gct cac ttt ggt gac ctg gat tat gtg aag cat	Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His	624
210 215 220		
45 gca ttg aca ttg ttc act gat ttg gct gca atc ttt gtg cga att ctt	Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu	672
225 230 235 240		
50 att ata atg ttg aag aat tca tct gag aga aat gag aag aag aag aaa	Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys	720
245 250 255		
55 agtaattttag ttgtggaga atacataatt agctgttag atgatgttg tcccttgtgt	877	
55 agtagttag ctatgtgttt gctgtaatgg taaaatgtcag gatttctttt aaacatcttc	937	
55 atatgtatcc gccaatatca taatgtgtcg tataacatca taccttggtt taaaaaaaaa	997	
60 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaann nnnnnnnnnnn	1057	
60 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnng tgtttgtgg ctacgttata	1117	
65 gtagacactc aagtaatcat tgagaggcactttgtg acctggatta tgtaagcat	1177	
65 gcattgacac tggcactga ttggctgca atctttgtgc gaattcttaa tataatgttgc	1237	
65 aataattcat ctaagagaaaa tgagaagaag aggaggagag attaataggt tgaccgatttgc	1297	
70 ctatgttag agtaattttgg ttgttagaga atacataatt agctgttag aagttgttg	1357	
70 tcccccttgg tagtttagtag ttagctatgt gtttgctgta atggtaaatgc tcaggatttc	1417	
70 ttttaaacat ttccatataatgt atttgctaataatcataataataataatcattcc	1477	

ttggtttaaa aaaagaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa

1510

5 <210> 14  
<211> 259  
<212> PRT  
<213> Glycine max

10 <400> 14  
Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe  
1 5 10 15

15 Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp  
20 25 30

Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile  
35 40 45

20 Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val  
50 55 60

Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr  
65 70 75 80

25. Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe  
85 90 95

30 Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln  
100 105 110

Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro  
115 120 125

35 Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys  
130 135 140

Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu  
40 145 150 155 160

Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser  
165 170 175

45 Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu  
180 185 190

Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln  
195 200 205

50 Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His  
210 215 220

Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu  
55 225 230 235 240

Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys  
245 250 255

60 Arg Arg Asp

65 <210> 15  
<211> 651  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum

70 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(651)  
<223> coding for BI-1 protein

<400> 15  
 gtc gca atg ccg ggt cga cga ttt cgt ctg acc tat gct ttg cct ggc 48  
 Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly  
 1 5 10 15

5 ctc atc tgc cgt ggg tgc tta cct gca cat tgc cct gaa cat tgg cgg 96  
 Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg  
 20 25 30

10 gat gct gac aat gct cgc gtg tat cgg aac cat cgc ctg gat gtt ctc 144  
 Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu  
 35 40 45

15 ggt gcc agt cta cga gga gag gaa gag gtt tgg gct gct gat ggg tgc 192  
 Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys  
 50 55 60

20 agc ctc ctg gaa ggg gct tca gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata 240  
 Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile  
 65 70 75 80

25 gac ttt gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc 288  
 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 85 90 95

30 gcc ttc ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag 336  
 Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu  
 100 105 110

35 tac ctg tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc 384  
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu  
 115 120 125

40 tgg ctg cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc 432  
 Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe  
 130 135 140

45 atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg 480  
 Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val  
 145 150 155 160

50 tac gac acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cac ggc gac atg gat 528  
 Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp  
 165 170 175

55 tac atc aag cac gcg ctc acc ctc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc 576  
 Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu  
 180 185 190

60 gtc cgc gtc ctc atc atc ttg ctc aag aac gca gcg gac aag gtc gga 624  
 Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly  
 195 200 205

65 ggc caa gaa gag gag gaa gag aag tcc 651  
 Gly Gln Glu Glu Glu Glu Lys Ser  
 210 215

70 <210> 16  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum

75 <400> 16  
 Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly  
 1 5 10 15

80 Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg  
 20 25 30

85 Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu  
 35 40 45

Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys  
 50 55 60

5 Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile  
 65 70 75 80

Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 85 90 95

10 Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu  
 100 105 110

Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu  
 115 120 125

15 Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe  
 130 135 140

20 Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val  
 145 150 155 160

Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp  
 165 170 175

25 Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu  
 180 185 190

Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly  
 195 200 205

30 Gly Gln Glu Glu Glu Glu Lys Ser  
 210 215

35 <210> 17  
 <211> 412  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)...(410)  
 <223> coding for BII-protein

45 <400> 17  
 tt gtt att gac ttg gat tcg agg att ctc gtc act gcg ttc gtc ggg  
 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly  
 1 5 10 15

50 acc gca gtt gct ttt gca tgc ttc tct ggc gct gcc atc atc gcc aag  
 Thr Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys  
 20 25 30

55 cgc agg gaa tac ctg tac ctc ggc ggt ctg ctt tca tct ggc ctc tcc  
 Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser  
 35 40 45

60 att ctt ctc tgg ctg cag ttt gct act tca atc ttt ggc cac acc agc  
 Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser  
 50 55 60

65 gcg acc ttc atg ttt gag ctc tac ttt ggc ctc ctg gtt ttc ctg gga  
 Ala Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly  
 65 70 75

70 tat atg gtg ttt gac acc cag gag atc atc gag agg gcg cac cgt ggg  
 Tyr Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly  
 80 85 90 95

gac atg gac tac atc aag cac gcg ctg act ctc ttc acc gac ttt gtt  
 Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val  
 100 105 110

47 95 143 191 239 287 335

gcg gtt ctt gtt cga atc ctt gtc atc atg atg aag aat gca cag gag 383  
 Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu  
 115 120 125  
 5 aaa tcc caa gac gag aag aag agg aag aa 412  
 Lys Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys  
 130 135  
 10 <210> 18  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays  
 15 <400> 18  
 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr  
 1 5 10 15  
 20 Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg  
 20 25 30  
 Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile  
 35 40 45  
 25 Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser Ala  
 50 55 60  
 30 Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly Asp  
 85 90 95  
 35 Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala  
 100 105 110  
 Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu Lys  
 115 120 125  
 40 Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys  
 130 135  
 45 <210> 19  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Triticum aestivum  
 50 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(342)  
 55 <400> 19  
 gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc ggt ggc ctg 48  
 Ala Ala Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu  
 1 5 10 15  
 60 ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg cag ttt gcc acg tcc 96  
 Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser  
 20 25 30  
 65 atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc 144  
 Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly  
 35 40 45  
 70 ctg ttg atc ttt ctg gga tac atg gtg tac gac acg cag gag atc atc 192  
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile  
 50 55 60  
 gag agg gcg cac cac ggc gac atg gac tac atc aag cac gac gtc acc 240  
 Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr

	65	70	75	80	
5	ctc ttc acc gac ttt gtc gcc gtc ctc gtc cg	atc ctc atc atc atc atg			288
	Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met				
	85	90	95		
10	ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag aag aag agg aag agg				336
	Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Arg Lys Arg				
	100	105	110		
	agg tcc tga				345
	Arg Ser				
15	<210> 20				
	<211> 114				
	<212> PRT				
	<213> Triticum aestivum				
20	<400> 20				
	Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu				
	1	5	10	15	
25	Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser				
	20	25	30		
	Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly				
	35	40	45		
30	Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile				
	50	55	60		
	Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr				
35	65	70	75	80	
	Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met				
	85	90	95		
40	Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg				
	100	105	110		
	Arg Ser				
45	<210> 21				
	<211> 403				
	<212> DNA				
50	<213> Zea mays				
	<220>				
	<221> CDS				
	<222> (1)...(402)				
55	<223> coding for BI1-protein				
	<400> 21				
	ggc agc atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag				
60	Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys				
	1	5	10	15	
	agg tac tgg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggg gcg tcg gtt				
	Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val				
65	20	25	30		
	gga ccc ctc atc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg				
	Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val				
	35	40	45		
70	aca gcg ttc gtg ggg act gcc att gcg ttc gcg tgc ttc tct tgc gcg				
	Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala				
	50	55	60		
	192				

## 19

gcc atg gtg gcc aag cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc 240  
 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu  
 65 70 75 80

5 tct tct ggc ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ttc gcc gcc tcc atc 288  
 Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile  
 85 90 95

10 ttc ggc cac caa tcc act agc agc ttc atg ttt gag gtc tac ttt ggg 336  
 Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly  
 100 105 110

15 ctg ctc atc ttc ctg ggc tac atg gtg tac gac acg cag gag gtc atc 384  
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile  
 115 120 125

20 gag agg gcg cac cac ggc g 403  
 Glu Arg Ala His His Gly  
 130

25 <210> 22  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

30 <400> 22  
 Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys  
 1 5 10 15

Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val  
 20 25 30

35 Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val  
 35 40 45

Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala  
 50 55 60

40 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu  
 65 70 75 80

Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile  
 85 90 95

45 Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly  
 100 105 110

50 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile  
 115 120 125

Glu Arg Ala His His Gly  
 130

55 <210> 23  
 <211> 410  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays

60 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)...(410)  
 65 <223> coding for BI1-protein

70 <400> 23  
 gc tgg aac atc ggc gtg agg ctg aca atg ctc ggt tgc atc ggc agc 47  
 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser  
 1 5 10 15

atc gac tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat  
 Ile Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr  
 95

	20	25	30	
5	ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro 35 40 45			143
10	ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala 50 55 60			191
15	ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg gcc atg Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met 65 70 75			239
20	gtg gcc agg cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc tcg tcg Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser 80 85 90 95			287
25	ggg ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ctc gcc gcc tcc atc ttc ggc Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly 100 105 110			335
30	cac tcc gca acc agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc atc His Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile 115 120 125			383
35	ttc ctg ggc tac gtg gtg tac gac acg Phe Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr 130 135			410
40	<210> 24 <211> 136 <212> PRT <213> Zea mays			
45	<400> 24 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser Ile 1 5 10 15			
50	Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly 20 25 30			
55	Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu 35 40 45			
60	Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe 50 55 60			
65	Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Val 65 70 75 80			
70	Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly 85 90 95			
75	Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly His 100 105 110			
80	Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe 115 120 125			
85	Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr 130 135			
90	<210> 25 <211> 463 <212> DNA <213> Triticum aestivum			
95	<220> <221> CDS			

<222> (1)...(462)  
<223> coding for BII-protein

5	<400> 25 ttc tca ggt acg ttc cgc aat tcc cgg agc gac gat ttc gtg ctc tgc Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys 1 5 10 15	48
10	gaa ctt cag cga gag ctc ccc cga tgc cgg gac gca acc ttg acg gtc Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val 20 25 30	96
15	gta tac gtg atc cca ata gtg ggc cga ata aaa tct gcc gcg ggt gct Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala 35 40 45	144
20	tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg aca atg ctt gcc Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala 50 55 60	192
25	tgt atc gga acc att gcc tgg atg ttc tct gtg cca gtc tat gag gag Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu 65 70 75 80	240
30	agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc ctg gaa ggg gct Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala 85 90 95	288
35	tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt gac cca agc atc Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile 100 105 110	336
40	ctc gtg aca ggg ttt gtt gga acc gcc atc gcc ttt ggg tgc ttc tct Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser 115 120 125	384
45	ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc gga ggc Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly 130 135 140	432
50	<210> 26 <211> 154 <212> PRT <213> Triticum aestivum	463
55	<400> 26 Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys 1 5 10 15	
60	Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val 20 25 30	
65	Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala 35 40 45	
70	Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala 50 55 60	
	Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu 65 70 75 80	
	Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala 85 90 95	
	Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile 100 105 110	
	Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser	

	115	120	125	
5	Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly 130 135 140			
	Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu 145 150			
10				
	<210> 27			
	<211> 388			
	<212> DNA			
15	<213> Zea mays			
	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (3)...(386)			
20	<223> coding for BII-protein			
	<400> 27			
	tc tgg aac atc ggc ggg acg ctg aca atg ctc ggt tgc gtc ggc agc Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser 1 5 10 15			47
25	atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr 20 25 30			95
30	ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro 35 40 45			143
35	ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala 50 55 60			191
40	ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg cca tgg Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp 65 70 75			239
45	tgg cag gcc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggc tgc tct cgt cga ggc Trp Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly 80 85 90 95			287
50	tct cca tcc tgc tct ggc tgc agc tcg ccg cct cca tct tcg gca ctc Ser Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu 100 105 110			335
55	cgc aac agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc att ctt ctg Arg Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu 115 120 125			383
	ggc ta			388
60	<210> 28			
	<211> 128			
	<212> PRT			
	<213> Zea mays			
	<400> 28			
65	Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile 1 5 10 15			
	Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly 20 25 30			
70	Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu 35 40 45			
	Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe			

50	55	60
Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp Trp		
65	70	75
80		
5	Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly Ser	
	85	90
95		
10	Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu Arg	
	100	105
110		
	Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu Gly	
	115	120
125		
15		
	<210> 29	
	<211> 1737	
	<212> DNA	
20	<213> Solanum tuberosum	
	<220>	
	<221> promoter	
	<222> (1)..(1737)	
25	<223> patatin promotor	
	<400> 29	
	aagcttatgt tgccatatacg agtagtttgc gatggtatac ttccataaaact ttaactttatg 60	
30	ttaaatttgt aatgataaaa tttttatttgt aaattaaaaaa ttacttataa aattgggcat 120	
	tataacatata gaaagacaaa ttgtgttaca tattttactt ttgactttaa tatgaatatt 180	
	tcaattttaaa tcattgtttt attttcttt tctttttaca ggtataaaag gtgaaaatttg 240	
	aagcaagatt gattgcaagc tatgtgtcac cacgttattt atacttttga agaaaattttt 300	
	acttatatgt ctttgtttag gagtaattat tgatatgttt tagttatgtt ttcttgcatt 360	
35	ttatgtttta gtataattttt agttatttt attatatgtat catgggtgaa ttttgatata 420	
	aatatttttg tcattaaata aattaattta tcacaacttg attactttca gtgacaaaaaa 480	
	atgtattgtc gtagtaccct tttttgttga atatgaataa ttttttttat ttgtgtacaa 540	
	ttgttaattgt cactacttat gataatattt agtgacatat atgtcgctgg taaaagcaaa 600	
	cactttcagt gacaaaataaa tagatttaat cacaaaaattt ttaacccccc ttataataat 660	
40	aaatttatcc tcattttataa cattttttttt cttttttttt tttttatataa taaaaaatag 720	
	tcttttagtga cgatcgtagt gttgagtcta gaaatctaa tttttttttt tttttttttt 780	
	catgcagtgt aaaataaaacc tcaaaaaggc cgttcagttcc atagagggggg tttttttttt 840	
	accccaaccc ttcacacata tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 900	
	ttcaagtctc atcacacata tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 960	
45	gtttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1020	
	tcgttcacaca aatattttttt tagttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1080	
	tcataatctt attttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1140	
	tccattttttt aaaaatattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1200	
	ataatactaa taaaaggatag aaaaaggaaa gtggatgttggg tttttttttt tttttttttt 1260	
50	taatatcaga gtcgtatcatg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1320	
	aaccaattcc gataaggcga gaaatattcat tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1380	
	gtgggtttttt ccttcagcaag gacgttgcgtt ccatacgagg ggggttatgtt gacaccccaa 1440	
	ccttcagcaaa agaaaaccc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1500	
	cttcatcacac atatataatattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1560	
55	acatcactaa cgacagtgc ggtgcggact ggtgcggact tttttttttt tttttttttt 1620	
	ttgggttatgt caaaactcaaa gtaaaaatttc tcaactttttt tacgtgccta tttttttttt 1680	
	gctttttttt tgctcaaaagc accaacaaaaa tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1737	
	<210> 30	
60	<211> 1317	
	<212> DNA	
	<213> Triticum aestivum	
	<220>	
65	<221> promoter	
	<222> (1)..(1317)	
	<223> germin 9f-3.8 gene promotor	
	<400> 30	
70	gaattcaagc tatcaacttc gaaccaagca cattgtatgtt aggtatcatt ggattccaga 60	
	tgtcgatgtt tccaagttgc tgaaacttgc gaagatccat accgacgaca atggttcaga 120	
	tatgtatgtt aagatattgc gaaataagaa gctacaagca tgttgcagg tagcgggcat 180	
	ggcgggtcccc ccatcatgat tcggaggggg agatgttgc ggtatccctc ctcatgtggg 240	

ttctgaggag atgaccattt gaggcctttt agccagccca aagaggtgca gaagcccact 300  
 accatttagg gttatgacct agggtcattt tggacttgc acatgagtgg atggggatgc 360  
 ttacccctcc atccagcagc caccaccaag ggtgacgaaa atcagttcat cctccaagag 420  
 5 agaagaagag agaaaaaccaa gagagcaagg gaagaagagg aagattgaag gaagaagaaa 480  
 agggagctcc tccccaaggt ttttatggtc catatccact atcttgctc cttcaaaactt 540  
 cggttccacc atcttttgta agattttctt aatccctatgt ttttgagcccc caaatcttgt 600  
 tgtgttcatc caagattcag aaatcttgcat gtatgagatc ctctagtgtc gtctagagaa 660  
 gaattttgtt tatcccacat ttgataatag tggaaagggg tttttttggc ttccggccat 720  
 10 gttttttccc ctcaaggtaa ggggtttcc acgtaaaatc ttgtgtctc ttgtgtatgc 780  
 ttgtgttgtt ccagaaactt actcctacca caagacacta gggccagtt cttttggaa 840  
 attctcccg aattgacccct ctccccagct tctcccaagaa ttgtcactcc atttttttt 900  
 acaattccta gctagttaaatg gtctaatgg ttaggaattt taaaaaaaaata tcaagtggca 960  
 attctgggag aagctggga gggggtaat tctggaaagaa ttggccaaaaa gaactggccc 1020  
 15 taggctgagg agtgccttgc ctgctgctt acattttgc ctcccatata ttgtgttgca 1080  
 tatgtttccct tcgctgctt gcaacgatcc ttgagttatgt acatgatgtg gtgctgagat 1140  
 tactttttt tcgctgctt tttttttttt ccacaagtgc atttgcgtgc taattccaa 1200  
 caatatgccca cccgcaactc atccaccata gctcagcagc aaccaccaat gccatagaca 1260  
 ctctcggtaa acaacctgtt gcttatcagt ctagctaagc gtgctgcata gcaagca 1317  
 20  
 <210> 31  
 <211> 959  
 <212> DNA  
 <213> *Arabidopsis thaliana*  
 25 <220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(959)  
 <223> CAB-2 promotor  
 30 <400> 31  
 gaattcatgt gtgagggcaa ttagtgattt taaaaataaa atttggtttt gtaaaaaact 60  
 tttactgtcg aaatttattt gggtgatgaa aaaatcagta aactacgaat gatagcttaa 120  
 35 agagtttcta tcaaagtgtat tgaggaatag tttgtgcac attttacatc taacaaaatg 180  
 tttctgttg tggttttca tctctacaaa tttgaattt tatgtatgat tagaaagata 240  
 gaatgagttt ctttagattt taaaaggtt gttcaagttt caaaacagat tactagaatc 300  
 atgataaaaa atttacaagc tacatattgt tttttttttt gatgtttt atgtttctgc 360  
 atagtttttca agtggtttcaaa caatcaattt gatgtttt atgtttctgc 420  
 aataatcagt gtttttgcattt ttttgcattt tgatitaaaa gcaaaaacaa ctgagttca 480  
 40 aggttaaattt aattacatta ttcatgagat ttatcagttt agtggataaa ctgacaatgg 540  
 aatcaatgtt attgttaaattt ggtgtgtat ttggacttctt aatgttactc tctatgtatgt 600  
 ttccgttcatc ggtatcacac tatctttact ttatattttt gaaagatca cacaataaag 660  
 ttatctctat tcagaactat taagctgtttt cccaaagact tgcaacatgt ggtctcgaaa 720  
 45 tgctttggct gcaatggaaaa aatcatagca aaagcttagt gactagagac tgccacataa 780  
 gaatagtaaa cgttaaacc aaaaatctcaa aatccaaatg agtaaagaga tatagattac 840  
 ttcatagata acaaacgtt ctcgcattt tcctatataa tccaaaccctt cctaaccatt 900  
 ttcaatcact ctcactcaca agttagtcac caaaaaaaaaaa aaaaacacaa aaagttca 959  
 50 <210> 32  
 <211> 445  
 <212> DNA  
 <213> *Zea mays*  
 55 <220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(445)  
 <223> PPCZm1 promoter  
 60 <400> 32  
 gaattccaaa aatagacacg gcaattttctt tattcacaga aaaaatataa ctacaactaa 60  
 tccccaaatgc cacagggattt agggatcaat ctgcacaaactt aaaaatgttctt ttacagtgtt 120  
 acttggcatg agtcatgtt ccatgagaga ggccgcacggt tcagcaaaagc aacataaaaat 180  
 65 tctccaaacg ggccccggcca cacacgatca ccatcaccctt cgggctcccg acccagtaca 240  
 aatagacacg cacactccca actccccaccatctcccgcc ggcacacccg cccaaatcagc 300  
 caatctccctc ctccctccctt gctctcagac gaggcggcgt tgccatcact ctccacttcc 360  
 cacggccgctt gccccggcttcg aggccggcaga gaattgtctg tgccgccccgg tggaaattt 420  
 attcgggtcggtt attccgtcgcc cccgcg 445  
 70 <210> 33  
 <211> 5455  
 <212> DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant  
5 expression vector pUBiBI-1

<400> 33  
 10 ggggatctc tagagtcgac ctgcaggcg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag 60  
 ccaggacaag cgaggaaacct tgcgtgcgag gcggggccgc cccgtccga ttgcattcga 120  
 cgcgcaggcg caggcgcaagg gatgcacgcc ttctactcga cctcgccgc ggcggcgagc 180  
 ggctggggcc acgactcccg caagaacctc cgcgcaggatc ccccgccgt gcagtccccac 240  
 ctcgaactcg ttatctcgc tctatgcctt gcactggcct catctggcgt gggtgcttac 300  
 ctacacattc ccctgaacat cggcgggatg ctgacaatgc tcgcttgcgt cggaaactatac 360  
 gcctggatgt tctcggtgcc agtctatgag gagaggaaga gtttgggct gctgatgggt 420  
 15 gcagccctcc tggaaaggggc ttgcgttggc cctctgatg agcttgcatt agactttgac 480  
 ccaagcatcc tcgtgacagg gtttgcggc accgcattcg ccttgggtt ctctctggc 540  
 gcccgcattca tcgccaaggc caggaggatc ctgtaccctcg gtggccgtc tcgtctggc 600  
 ctgtcgatcc tgctctggc gcagggttgc acgtccattt tggccactc ctctggcagc 660  
 ttcatgtttt agtttactt tggcctgttg atcttcctgg ggtacatggt gtacgacacg 720  
 20 caggagatc tcgagagggc gcaccatggc gacatggact acatcaagca cggccctcacc 780  
 ctcttcaccc actttgttc cgtcctcgcc cgagtccatc tcatcatgtc caagaacgca 840  
 ggcgacaagt cggaggacaa gaagaagagg aagagggggc cctgaaacgtw tctcccgcac 900  
 atgttagatac cgtcaccgcg tcgacccgtc ggcattcccg ctgaaatcac cagtctctc 960  
 ctacaaatct atctctctca taataatgtg tgatgttgc cccatggatc gaaattagggt 1020  
 25 tcttataggg ttgcgtcat gtgttgcgtc tataagaaac ccttagtatg tattttgtatt 1080  
 tgtaaaaaatc ttcttatcaat aaaatttcta attcctaaaa cccaaaatcca gtgggtacccg 1140  
 agcttgcattt caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtactg ggaaaaccct 1200  
 ggcgttaccc aacttaatcg ctttgcagca catccccctt tcggccatgt gctaatagc 1260  
 gaagaggccc gcaccgtatc cccttcccaa cagttgcgc gcctgaatgg cgaatggcgc 1320  
 30 ctgtgcgggt attttctct tacgcattcg tgcggattt caccatggatc atggtgact 1380  
 ctcagtacaa tctgcgtctga tgccgcattag taaaggccgc cccgacaccc gccaacaccc 1440  
 gtcgacgcgc cttgcacggc ttgtctgtc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc 1500  
 gtctccggga gtcgcattgtc tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cggcagacga 1560  
 aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat gttttcttag 1620  
 35 acgtcagggt gcactttcg gggaaaatgtg cgcggaaaccc ctatttgttt atttttctaa 1680  
 atacattcaa atatgtatcc gtcgtatgaga caataacacct gataatgtc tcaataat 1740  
 tgaaaaagga agatgtatgg tatttacatc ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg 1800  
 gcattttggc ttccgttgc tcgtcaccatc gaaacgttgc tgaaagtaaa agatgtgaa 1860  
 gatcagggtt gtcgcacgtt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt 1920  
 40 gagagtttc gccccgaaga acgtttcca tgcggatc tttttttttt atgtatgac tctgtatgt 1980  
 ggcgcgttat tatcccgtat tgacgcggg cttttttttt catacactat 2040  
 tctcagaatg acttgggttgc gtaatccatc gtcacacaa agcatcttac ggatggcatg 2100  
 acagtaagag aattatgcag tgctccatc accatgtatc ataactactgc ggccaactt 2160  
 ctctgacaa cgatcgagg accgaaggatc ctaaccgtt tttgcacaa catggggat 2220  
 45 catgtactc gccttgcattc ttggaaaccc gactgtatc aagccatacc aaacgacgag 2280  
 cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaaactatt aactggcgaa 2340  
 ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagacttgc tggaggccga taaagtgc 2400  
 ggaccactc tgcgctccgc cttccggct ggctgggtt ttgtctgatc atctggagcc 2460  
 ggtgagcgtg ggtctcgccg tttttttttt gcaactatgg cagatgttgc gccctccgt 2520  
 50 atctgtatc tctacacgc ggggagtcg tttttttttt atgaacgcgg tagacagatc 2580  
 gctgagatag gtgcctcact gattaagcat ttgttactgt cagaccaatc ttactcatat 2640  
 atacttttaga ttgatttaaa acttcatttt taattttaaa ggatcttagt gaagatcctt 2700  
 tttgataatc tcatgaccaa aatcccttta cgtgatgtttt cgttccatgc agcgtcagac 2760  
 cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttgc gatctttttt ttctgcgtcg aatctgtgc 2820  
 55 ttgcaaaacaa aaaacccacc gtcaccagcg gtggttttt tgccggatca agagctacca 2880  
 actcttttc cgaaggtaac tggcttcgcg agagcgcaga tccaaaatac tggcttctca 2940  
 gtgttagccgt agtttaggcg cccatcaag aactctgtatc caccgcctac atacctcgct 3000  
 ctgctaattcc tggatccatc ggctgcgtcc agtggcgata agtctgttgc taccgggtt 3060  
 gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcggtc 3120  
 60 acacagccca gttggagcg aacgacatc accgaactga gatacttaca gctgtacgtt 3180  
 tgagaaagcg ccacgcctcc cgaaggggaga aaggcgacca ggtatccggt aagcggcagg 3240  
 gtcggAACAGC gagagcgcac gaggagatc ccaggggaa acgccttgc tctttatagt 3300  
 ccttgcgggt tccgcaccc ctgacttgcg cgtcgatattt tttttttttt tttttttttt 3360  
 cggaggccat gggaaaacgc cagcaacgcg gccttttac gtttcttgcg cttttttttt 3420  
 65 ctttttgcgc acatgttctt tccctgcgtt tccctgtatt ctgtggataa ccgtatattacc 3480  
 gcctttgagt gagctgatc cgtcgcgcgc agccgaacga ccggcgccag cgaatcgatc 3540  
 agcgaggaag cggaaaggcg cccatcaatc aaaccgcctc tcccccgcgc ttggccgatt 3600  
 cattaatgcg gtcggacacg cagggtttcc gactggaaag cggcgatgt ggcacacga 3660  
 attaatgtga gtttagctac tcattaggca ccccgatgt tacactttat gcttccggct 3720  
 70 cgtatgttgc ttggaaatgtt gaggcgatca caatttcaca caggaaacag ctatgaccat 3780  
 gattacgaat tcccatgcct cggaggatcta acatgttgc atacatgaag taacatgtc 3840  
 ctacggtttataattctt agttgatatt tactgttact tagatagatg tatatacatg 3900  
 ctttagataca tgaagtaaca tgctccttacatc gttcctttaa tcattattga gtacctatata 3960

attctaaataa atcagtagatgt tttaaattat tttgattttt ctggtaactt gatagatgt 4020  
 tatatacatg ctcacacatg cttagataca tgaagtaaca tgctgctacg gtttagtcat 4080  
 tattgagtgc ctataatttc taataaatca gtatgtttt aattatttt attttactgg 4140  
 tacttagata gatgtatata tacatgctca aacatgctt gatacatgaa gtaatatgt 4200  
 5 actacggttt aattgttctt gagtagctt atattctat aaatcagtat gttttaaattt 4260  
 attcgattt tactggtaact tagatagatg tataatatac tgccttagata catgaagtaa 4320  
 catgctacta cggttaattt gttcttgaat accttatata tctaataat cagtagttt 4380  
 taaatttattt cgattttact ggtacttaga tagatgtata tatacatgtc cgaacatgt 4440  
 10 tagatacatg aagtaacatg ctacatatata attataataa atcagtagt gtttaaattt 4500  
 ttgattttt gttttttttt gttttttttt tttttttttt tttttttttt 4560  
 aagtaacatg ctggtaactt gatagatgtata tatacatgtc caaacatgt tagatacatg  
 atgaaaaatccatg ttaatccat tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4620  
 15 atatacatgc tcgaacatgc ttagatacat gaagtaacat gctactacgg tttatcggt 4680  
 cttagtaccat tataatccat aataaatcag tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4740  
 acttagatag atgtatatac atgcttagat acatgaagta acatgctact atgatattat 4980  
 20 cgttcttgat tacctatata ttctatataa tcagtagt gttttttttt tttttttttt 5040  
 tggtaacttag atagatgtat atatacatgc tcgaacatgc ttagatacat gaagtaacat 5100  
 gctactacgg tttatccat cttagtaccat tataatccat aataaatcag tttttttttt 5160  
 attatccat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5220  
 25 gctactgtt aatccatcgat gaataccat atattctat atatcagtat gttttttttt 5280  
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5340  
 taccaggatgt gatgagatgt catggcgctt tcatacgatc tttttttttt tttttttttt 5400  
 agactgttct tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5455

<210> 34  
 <211> 12633  
 30 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pLo114UbIBI-1

<400> 34  
 aattcactgg ccgtcggtttt acaacgactc agagcttgc accggggcccg atctagtaac 60  
 atagatgaca ccgcgcgcga taattttatcc tagtttgcgc gctatattttt gttttctatc 120  
 40 gcgattttaaa tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 180  
 atgcatttaca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 240  
 atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaaactttt attgccaat gtttgaacga 300  
 tcggggatca tccgggtctg tggcgggaa tccacgaaa tatccgaacg cagcaagatc 360  
 tagagcttgg gttccgcctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgcgtc 420  
 45 gaatcgggag cggcgatacc gtaaaagcagc aggaaggcgtt cagccccattc gcccgcgaagc 480  
 tcttcagcaa tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 540  
 cggccacagt cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 600  
 gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gaggctggc 660  
 aacagttcg tggcgccgg cccctgtatcc tttttttttt tttttttttt 720  
 50 ccggcttcca tccgagttacg tgctcgatcg atgcgtatgtt tttttttttt tttttttttt 780  
 caggttagccg gatcaagcgtt atgcagccgc cgcattgcattt cagccatgtat tttttttttt 840  
 tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tttttttttt tttttttttt 900  
 cagtcccttc ccgcttcagttt gacaacgtcg agcacagctg ccgaaggaa gcccgtcg 960  
 gccagccacg atagccgcgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1020  
 55 gtcttgacaa aaaaacccgg gggccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcacaggc 1080  
 cagccgattt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1140  
 gaacctcggt gcaatccatc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1200  
 atttggattt agagttaata tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1260  
 cagtggagca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1320  
 60 aacgcgcaat aatggtttctt gacgtatgtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1380  
 ctgagttggct cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1440  
 cgtcatcgcc gggggatca acgtactcc tttttttttt tttttttttt 1500  
 tttcccgctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1560  
 65 attagattgt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1620  
 cggatgtttaa tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1680  
 aattttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1740  
 ctcggcacaat aatcaccacg cttttttttt tttttttttt tttttttttt 1800  
 tttcccgctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1860  
 70 gaggccgcca aggccccagg cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1920  
 atcgccgacg cccgcgagct gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1980  
 ctgcttggcg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2040  
 cccaccggagg ccaggccggcg cttttttttt tttttttttt tttttttttt 2100  
 ctggccggccg cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2160

	aggacgaacc	gttttcatt	accgaagaga	tcgaggcga	gatgatcg	gcgggtac	2220
5	tgttcgagcc	gcccgcac	gtctcaaccg	tgccgctca	tgaaatcctg	gcgggttgc	2280
	ctgatgccaa	gctggccgc	tgccggcca	gcttggccgc	tgaagaaaac	gagcggccgc	2340
	gtctaaaaag	gtgatgtgt	tttagtataa	acagcttgc	tcatcggtc	gctgcgtata	2400
	tgtatcgatg	agtaataaaa	caataacgc	agggaaacgc	atgaaggta	tcgtctact	2460
	taaccagaaa	ggcgggtcg	gcaagacgc	catcgaacc	catctagccc	gcgcctgc	2520
10	actcgccgg	gcccgtat	ttttagtgc	ttcccgatccc	caggcagtg	cccgcattg	2580
	ggcggccgt	cggaaagatc	aaccgcta	cgttgcgc	atcgaccgc	cgacgattga	2640
	ccgcgacgt	aaggccatcg	gcccgcgc	cttcgtatg	atcgacggag	cgccccaggc	2700
15	ggcggactt	gctgtgtcc	cgatcaaggc	agccgacttc	gtgctgattc	cggtgcagcc	2760
	aaggcccttac	gacatatgg	ccaccgcgc	cctggggag	ctgggtaagc	agcgcattga	2820
	ggtcacggat	ggaaggctac	aaggccctt	tgctgtgtc	cgggcatac	aaggcgcg	2880
	catcggcggt	gagggttcc	aggcgctgc	cgggtacag	tgccccattc	ttgagtcccg	2940
20	tatcacgcag	cgcgtgagct	acccaggc	tgccggcc	ggcacaaccc	ttcttgaatc	3000
	agaaccccgag	ggcgacgct	cccgcgaggt	ccaggcgt	gcccgtgaaa	ttaaatcaaa	3060
	actcatttga	gttaatgagg	taaagagaaa	atgagaaaa	gcacaaacac	gctaagtgc	3120
	ggccgtccga	gcccacgc	cagcaaggct	gcaacatgg	ccagcctggc	agacacgc	3180
25	gccccatggc	gggtcaactt	tcagttcc	cgggaggatc	acaccaagat	gaagatgtac	3240
	gccccatggc	aaaggcaagac	cattaccg	ctgctatctg	aatacatcg	gcagctacca	3300
	gagtaataatg	gcaaatgaat	aattagtag	atgaatttta	gcccgtaaag	gaggccgcat	3360
	ggaaaatcaa	gaacaaccag	gcaccgacgc	cgtggatgc	ccatgtgt	gaggaacggg	3420
	cgggtggcca	ggcgtaagcg	gctgggtt	ctgccc	tgcaatggca	ctggaacccc	3480
30	caagccccag	gaatccgcgt	gagcggcgc	aaaccatcc	gcccgtata	aatcgccgc	3540
	gcccgtgggt	atgaccctgt	ggagaagg	aaggccgc	aggccgc	gcggcaacgc	3600
	atcgaggcag	aaggccccc	ccgtgat	tgccaa	cgcgtatc	aatcccaaa	3660
	gaatcccgcc	aaccgcgc	agccgtgc	ccgtcgat	ggaaggccgc	caagggcgc	3720
35	gagcaaccag	atttttcg	tccgatgc	tatgacgt	gcacccgc	tagtcgc	3780
	atcatggac	tggcc	ccgtctgtc	aagcgtgacc	gacgagct	cgaggtgatc	3840
	cgctacgac	ttccagac	gcacgt	gttccgc	ggccggcc	catggccagt	3900
40	gtgtgggatt	acgacc	actgatggc	gttcc	taacc	catgaaccg	3960
	taccgggaa	ggaagggg	caagccgc	cgcgtt	gtcc	tgccgacgt	4020
	ctcaagtct	gcccgg	cgatggc	cgcgtt	ccac	atccgc	4080
	atccgttta	acaccacgc	cgttccat	cagcgtac	actt	aaacatgc	4140
45	ctgggtacgg	tatccgaggg	tgaaggctt	attagcc	acaagat	aaagagc	4200
	accgggcgc	cggagat	cgagatc	ctagctg	gatgtac	cgagatcaca	4260
	gaaggcaaga	acccgacgt	gctgacg	cacccg	actt	cgatccgc	4320
	atccgcgtt	ttctctacc	cctggc	cgcgc	gcaaggc	agccagatgg	4380
50	tttttcaaga	cgtatc	acgcgt	gtcc	atgtca	gttctgtt	4440
	accgtgc	agctgtat	gtcaat	ccggag	gatgtt	ggaggaggc	4500
	ggcaggct	gcccgt	agtcat	ctggcc	ggat	gttctgtt	4560
55	gcccgttct	aatgtacgg	gcatgt	ggcaattt	ccctag	ggaaaaaaag	4620
	cgaaaagg	tcttctgt	ggatagc	tacat	ggga	gtacattgg	4680
	aaccggaa	cgtacatt	gaacccaa	ccgtac	acccaa	gtacattgg	4740
60	gtgactgat	taaaaag	aaaagg	tttccgc	aaaactt	aaaattt	4800
	aaaacttta	aaaccgc	ggcgt	taact	tttgc	tttgc	4860
	ctgcaaaa	cgccttac	tcggc	cgctt	ccgcgc	agccgaag	4920
	cctatcg	ccgttgc	ctaaaat	gctgg	ccccgc	ttegcgtc	4980
65	cgccgaca	ccgcgcgt	gccact	cgccgc	cacat	cacccgc	5040
	cgcgctt	ggtatgac	gtgaaa	ctgac	cagct	ccgcgtt	5100
	agttgtct	taaggcgt	ccggag	acaagg	cagg	ccgcgtt	5160
	tggcgggt	cgggcgc	ccatgac	gtcact	ccgcgc	ccgcgtt	5220
70	cttaactat	cggtatc	gcatgtt	ctgagat	accat	gttgc	5280
	ccgcacagat	gctgttgc	aaaatacc	atcagg	cttccgc	ctcgctact	5340
	gactcg	gtcgg	tcggc	cgagg	cagtc	aaaggcg	5400
	55	atacggtt	ccacaaatc	agggata	gcaggaa	acatgt	5460
	caaaaggc	ggaaccgt	aaaggcgc	ttgttgc	tttccat	gtccgc	5520
	cctgac	atcacaaaa	tcgac	agtc	ggcga	gacaggact	5580
	taaaaggat	aggcgtt	cccttgc	cccttgc	cccttgc	tccgacc	5640
60	ccgcttac	gatactgt	cgcctt	ccttgc	ccgttgc	ttctcat	5700
	tcacgctgt	gttatctc	ttcgg	gtcgt	ccaag	ctgtgc	5760
	gaacccccc	ttcagcc	ccgtgc	ttatcc	cttgc	tgatcc	5820
	ccggtaa	acgactt	gccact	gcagg	atac	tgatcc	5880
65	aggtatgt	gcccgt	aggtt	aatgtt	actac	tgacag	5940
	aggacat	tttgtat	cgct	tttgt	tttgt	ctacact	6000
70	agcttctgt	ccggcaaca	aaccac	ggtag	cattc	aaagat	6060
	cagattac	gcaaaaa	aggat	ccgtt	ttttt	tttgc	6120
	gacgct	ggaac	ctcac	gggattt	tttgc	tacgggt	6180
	atttgc	ttttgc	tgcac	aaaata	aaagc	gacgtat	6240
	tttgc	agcaattt	tgctt	atctaa	tgat	tgatcc	6300
	agccgcgt	gctgttgc	atttct	agacat	ttcc	tttgc	6360
	tcccttca	cgtatgg	aaatctt	aactgt	ccgcact	tttgc	6420
	tcttctgt	caagata	ctgtt	tttgt	tttgt	tttgc	6480
	aggcgcttca	ttggcc	ggcagc	tcctt	ccgcgt	tttgc	6540

	ctgtacccaaa	tgcgggacaa	cgtaaagcaact	acatttcgct	catcgccagc	ccagtcgggc	6600
	ggcgagtcc	atagcgttaa	ggtttcattt	agccctcaa	atagatccgt	ttcaggaacc	6660
	ggatcaaaga	gttcctccgc	cgctggaccc	accaaggcaa	cgctatgttc	tcttgctttt	6720
	gtcagcaaga	tagccagatc	aatgtcgtatc	gtggctggct	cgaagatacc	tgcagaatgt	6780
5	tcattgcgt	gccattctcc	aaattgcagt	tcgcgcttag	ctggataacg	ccacggaatg	6840
	atgtcgtgt	gcacaacaaat	ggtactctt	acagcggga	aatctcgct	ctotccaggg	6900
	gaagccgaag	tttccaaaag	gtcggtgtatc	aaagctcgcc	gctgtgtttc	atcaagcctt	6960
	acggtcacccg	taaccagcaa	atcaatataca	ctgtgtggct	tcaggccgc	atccactgctg	7020
10	gagccgtaca	aatgtacggc	cagcaacgtc	ggttcgagat	ggcgtctgat	gacgccaact	7080
	acctctgata	gtttagtgcga	tacttcggcg	atcaccgctt	cccccatgt	gtttaacttt	7140
	gttttagggc	gactgcccgt	ctgcgtaaaca	tcggtgtgc	tccataacat	caaacatcga	7200
	cccacggcgt	aacgcgttg	ctgcttgat	gcccggaggca	tagactgtac	ccccaaaaaa	7260
15	cagtataac	aaggcatgaa	aaccgcact	gccccgggtt	catggacata	caaatggacg	7320
	aacggataaa	ccttttcacg	ccctttttaa	tatecgattta	ttctaataaa	cgctcttttc	7380
	tcttaggttt	accgcacaaat	atatccgttc	aaacactgtat	agtttaaact	gaaggcggga	7440
	aacgacaatc	agatctagta	ggaaacagct	atgaccatga	ttacgcctaa	cttgcgtatcc	7500
20	tgcaggtcga	ctctagagga	tcgatccccg	ggtaggtcag	tcccttatgt	taclgtctgt	7560
	agaaaacccca	accgtgaaa	tcaaaaaact	cgacggcctg	tgggcattca	gtctggatcg	7620
	cgaaaaactgt	ggaatttggtc	agcgttggtg	ggaaagcgcg	ttacaagaaa	gcccccaat	7680
	tgctgtgcca	ggcgtttta	acgtacgtt	cgccgatgca	gatattcgta	attatgcggg	7740
	caacgtctgg	tatcagcgcg	aagtctttat	accgaaagggt	tgggcaggcc	agcgtatcg	7800
	gctgcgtttc	gatgcggtca	cttacacgg	caaagtgtgg	gtcaataatc	aggaagtgtat	7860
	ggagcatcag	ggcgctata	cgccattttga	agccgtatgc	acgcgtatgt	ttatggccgg	7920
25	gaaaagtgt	cgtaaagttc	tgcttctacc	tttgatataat	atataataat	tatcatataat	7980
	tagtagtaat	ataatatttc	aaatattttt	ttcaaaaataa	aagaatgtag	tatatagaa	8040
	ttgcttttct	gtagtttata	agtgtgtata	ttttatatta	taactttct	aatatatgac	8100
	caaaaattgt	tgatgtcag	gtatcacccgt	ttgtgtgaac	aacgaactga	actggcagac	8160
	tatcccggcc	ggaatgtgtt	ttaccgcaga	aaacggcaag	aaaaagcagt	cttacttcca	8220
30	tgatttctt	aactatgccc	gaatccatcg	cagegtatg	ctctacacca	cgccgaaacac	8280
	ctgggtggac	gatatcaccg	tggtgacgca	tgtcgcgca	gactgttacc	acgcgtctgt	8340
	tgactggcag	gtggggccca	atggtgatgt	cagcgttga	ctgcgtatgt	cggtatcaaca	8400
	ggtggttgc	actggacaag	gcactagcgg	gactttgca	tggtgatc	cgcacctctg	8460
	gcaacccgggt	gaaggttatc	tctatgaact	gtgcgtcaca	gccaaaagcc	agacagagtg	8520
35	tgatatactac	ccgcgtccgc	tcggcatccg	gtcaagtggca	gtgaagggcg	aacagtccct	8580
	gattaccac	aaacccgtt	actttacttgg	cttggctgt	catgaagatg	cgacttgcg	8640
	tggcaaaggaa	ttcgtataacg	tgctgtatgtt	gcacgaccac	gcattaatgg	actggatgg	8700
	ggccaactcc	tacgttaccc	cgccattaccc	ttacgctgaa	gagatgtcg	actggcaga	8760
	tgaacatggc	atcgttgtga	ttgatgaaaac	tgctgtgtc	ggctttaacc	tcttttagg	8820
40	cattggttc	gaagcgggca	acaagccgaa	agaactgtac	agcgaagaggg	cagtcaacgg	8880
	ggaaaactcg	caagcgcact	tacaggcgtat	taaagagctg	atagcgtgt	acaaaaaacca	8940
	cccaacgcgt	gtgttgtgg	gtattggccaa	cgaaacccggat	accctgtccgc	aagggtcagc	9000
	gaaatattt	gcccgtactgg	cggaaaccaac	gctgtttactc	gaccggacgc	gtccgatcac	9060
	ctgcgtcaat	gtaatgttct	gcyacgtctca	caccgatacc	atcagcgtatc	tctttgtatgt	9120
45	gctgtgcctg	aaccgttatt	acggatgttgc	tgtccaaagc	ggcgttatttg	aaacggcaga	9180
	gaagggtactg	gaaaaagaac	ttctggcttgc	gcaggagaaaa	ctgcgtatcgc	cgattatcat	9240
	caccgaatac	ggcgtggata	cgttagccgg	gctgcactca	atgtacaccc	acatgtggag	9300
	tgaagagat	cagtgtgtat	ggctggatata	gtatccaccgc	gtctttgtatc	gcgtcagcgc	9360
	cgtcgtcggt	gaacaggat	ggaatttgcgc	cgattttgcg	acctcgcaag	gcattattgcg	9420
50	cgttggcggt	aacaagaaag	ggatcttcac	tcgccccgc	aaaccgaagt	cggccggcttt	9480
	tctgtgtccaa	aaacgcttgg	ctggcatggaa	cttcgggtaa	aaacccgacg	aggggaggcaa	9540
	acaatgagag	ctcgtttttc	cccgtatcggt	caaacatttttgc	gcaataaagg	ttcttaagat	9600
	tgaatctgt	tgccgttctt	gcatgtatca	tcatataatt	tctgttgaat	tacgttaagc	9660
	atgtataataat	taacatgtaa	tgcgtatgtat	tattttatgag	atgggtttttt	atgatttagag	9720
55	tcccgcattt	atacattttt	taacgcgtat	aaaacaaaat	atancgcgca	aactaggata	9780
	attatcgcg	cgccgtgtca	tctatgttac	tagatcgggaa	attccatgtc	ctcgaggatc	9840
	taacatgttt	agatacatgt	agtaacatgtat	atattctataat	aaatctgtat	gttttaaaat	10020
	tttactggta	cttagataga	tgtatataaca	tgcgtttagata	catgaagtaaa	catgtcttca	9960
	cagttccattt	aatcattttt	gagttacccat	atattctataat	aaatctgtat	catgtatgtat	10080
60	atttttattt	tactggtaat	tagatagatgt	tatataataca	tgcttcaaaa	tgcttagata	10140
	catgttttttt	catgtgtctat	cggttttagtc	attattgtat	gcctataatt	tctaataaaat	10200
	cagtgtttt	taaaatatttt	tgatttttat	ggtactttaga	tagatgtata	tatacatgtct	10260
	caaacatgt	tagatacatgt	agaatataatgt	ctactacgtt	ttaattgttc	ttgagttacct	10320
	atataatttca	ataaaatcgt	atgtttttaaa	ttattttgtat	tttactggta	cttagataga	10380
65	tgtatataata	catgttttaga	tacatgtatgt	aacatgtctac	tacgtttttaa	ttgttcttgc	10440
	ataccatataat	attctataataa	atcgtatgtat	tttaaattttat	ttcgattttt	ctgttactta	10500
	gatagatgtat	tatatacatgt	ctcgaaacatgt	cttagatataca	tgaagtaaca	tgctcatat	10560
	atattataat	aaatctgtat	gtctttttttt	atttttgtat	tactggtaat	tagatagatgt	10620
	tatatactatgt	ctcaaaatgt	cttagatataca	tgaagtaaca	tgctactaa	gtttaatcat	10680
70	tattttttttt	tatataattttt	taataataatgt	gtatgtttttc	aattttttttt	atttttactgg	10740
	tactttttttt	taatgtatata	tatcatgtctgt	aaatctgtat	gatactgttta	gtaacatgtct	10800
	actatggttt	attgtttttt	agtacccatata	tattttataa	aatctgtat	ttttttttttt	10860
	tttcgtttttt	actgtttttt	agatagatgtat	atatacatat	gtcgttttttt	gtttttttttt	10920
	atgaagtaac	atgtttttttt	gtttttttttt	ttctttttttt	cctttttttttt	cttataataat	10980

	agtatgtctt	aaatttatctt	gattttactg	gtacttagat	agatgtatat	acatgcttag	10980
	atacatgaag	taacatgcta	ctatgattt	atcgftcttg	agtacacctata	tattctaata	11040
	aatcagtatg	tttttaatta	ttttgatttt	actggtaactt	agatagatgt	atataatacat	11100
5	gctcgaacat	gcttagatac	atgaagtaac	atgtactac	ggtttaatca	ttcttgagta	11160
	cctatatatt	ctaataaaatc	agtatgttt	taattatttt	gatattactg	gtacttaaca	11220
	tgtttagata	catcatatag	catgcacatg	ctgctactgt	ttaatcattc	gtgaataacct	11280
	atatattcta	atatatcagt	atgtcttcta	attattatga	ttttgatgtt	cttgtatgg	11340
	ggcatatgct	gcagctatgt	gtagattttg	aatacccaat	gtgatgagca	tgcattggcgc	11400
10	cttcatagtt	catatgctgt	ttatttcctt	tgagactgtt	ctttttgtt	gatagtacc	11460
	ctgtgtttg	gtgattctta	tgccccccc	gatcctctag	agtgcacctg	caggcggccg	11520
	cactagtat	taggatcca	acgcgagcca	ggacaaggcg	ggaacaccttgc	gtgcgaggcg	11580
	aggccgcccc	gctccgattt	gattcgcacg	gcaggcgcag	gcccagggtat	ggacgccttc	11640
	tactcgacct	cgtcgccggc	ggcgagccgc	tggggccacag	actccctcaa	gaacttccgc	11700
15	cagatctccc	ccgcccgtca	gtccccaccc	aagctcgttt	acctgactct	atgccttgca	11760
	ctggcctcat	ctgcccgtgg	tgcttaccta	cacattgccc	tgaacatcg	cgggatgtcg	11820
	acaatgctcg	cttgtgtcg	aactatcgcc	tggatgttct	cggtgcagg	ctatgaggag	11880
	aggaagaggt	ttgggctgt	gatgggtgca	gccctccctgg	aaggggcttc	ggttggac	11940
	ctgattgagc	ttgcacataga	ctttgaccca	agcatccctg	tgacagggtt	tgcggaaacc	12000
20	gccatcgcc	ttgggtgtt	ctctggcgcc	gcccatacg	ccaagcgcag	ggagtaactg	12060
	tacctcggt	gcctgcttc	gtctggcctg	tcgatcctgc	tctggctgca	gtttgtcacg	12120
	tccatctttg	gccactctc	tggcagctt	atgtttgagg	tttactttgg	cctgttgatc	12180
	ttccctgggt	acatgggtt	cgacacgcag	gagatcatcg	agagggcgca	ccatggcgac	12240
	atggactaca	tcaagcgc	cctcaccctc	ttcaccgact	tttgtgcgt	cctcgatcg	12300
25	gttcctcat	tcaatcgctaa	gaacgcaggc	gacaagtccg	aggacaagaa	gaagaggaag	12360
	agggggctct	gaacgtwtct	ccgcacatg	tagataccgt	caccgcgtcg	acctgcaggc	12420
	atgcccgt	aaatcaccag	tctctctcta	caaatactatc	tctctctataa	taatgtgtga	12480
	gtagttccca	gataaggaa	tttagggttct	tatagggttt	cgctcatgt	ttgagcatat	12540
	aagaaaacct	tagtatgtat	ttgtatgtt	aaaatactt	tatcaataaa	atttctaatt	12600
30	cctaaaaacca	aaatccagtg	ggtaccgagc	tcg			12633

30

<210> 35  
 <211> 5598  
 <212> DNA

35 &lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pOXoBI-1

40

&lt;400&gt; 35

	ggggatcctc	tagagtgcac	ctgcaggcgg	ccgcactagt	gattaggatt	ccaacgcgag	60
	ccaggacaag	cgaggaacct	tgctgtcg	gcccgtccga	ttcgattcga	120	
	cgccgaggcg	caggcgcagg	gatggacgc	ttctactcga	cctctgtcg	ggccgcgagc	180
45	ggctggggcc	acgactccct	caagaacttc	cgccagatct	ccccgcgcgt	gcagtcac	240
	ctcaagctcg	tttacctgac	tctatgttt	gcactggct	catctgcgt	gggtgcttac	300
	ctacacattg	ccctgaacat	cgccggatg	ctgacaatgc	tcgcttgcgt	cggaactatc	360
	gcctggatgt	tctcggtgc	agttatgtag	gagggaga	ggttgggt	gctgatgg	420
	gcagccctcc	tggaaagggc	ttcggttgg	cctctgttgc	agcttgcac	agacttttgc	480
50	ccaacatcc	tcgtgcacgg	gtttgtcg	accgcacatc	ccttgggt	cttctctggc	540
	gcccgcata	tcgccaagcg	caggagatc	ctgtaccc	gtggcctgt	ctcgatcg	600
	ctgtcgatcc	tgctctggct	gcagtttgc	acgtccatct	ttggccactc	ctctggcagc	660
	ttcatgtttt	aggtttactt	tggctgtt	atcttcctgg	gttacatgtt	gtacgacac	720
	caggagatca	tcgagaggc	gcacccatgc	gacatggact	acatcaagca	cgccctcacc	780
55	cttcctacccg	actttgtgc	cgtctctgc	cgagtccatc	tcatcatgt	caagaacgc	840
	ggcacaatgt	cggaggacaa	gaagaagagg	aaggggggt	cctgaacgtw	tctccgcac	900
	atgtatagatc	cgtcaccgc	tcgacctgc	ggcatgcgc	ctgaaatcac	cagtctct	960
	ctacaaatct	atctctctca	taataatgt	ttagatgtt	ccagataagg	gaatttaggt	1020
60	tcttataggg	tttcgctcat	gtgttgc	tataagaaac	ccttagtata	tatttgcatt	1080
	tgtaaaatac	ttctatcaat	aaaatttcta	atcctaaaa	ccaaaatcca	gtgggttacc	1140
	agtcgaatt	caagcttgc	actggccgc	gttttacac	gtctgtact	ggaaaaacc	1200
	ggcatttaccc	aacttaatcg	ccttgcac	catccccctt	tcggcactgt	gcgtaatag	1260
	gaagaggccc	gcaccgcac	ccccctccaa	cagggtgc	gcctgaatgg	cgaatggc	1320
65	ctgatgcgt	attttctct	tacgcacatc	tgcggtattt	cacaccgcac	atggtgcact	1380
	ctcagtcacaa	tctgcctc	tgccgcac	ttaagccac	cccgacaccc	gccaacaccc	1440
	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgc	ccggcattcc	tttacagaca	agctgtgacc	1500
	gtctccggga	gctgcacatgt	tcagagggtt	tcaccgtat	caccgaaac	cgcgagac	1560
	aaggccctcg	tgatacgcct	attttata	gttaatgtca	tgataataat	gttttctt	1620
70	acgtcagggt	gcactttcg	ggggaaatgt	cgcggaaacc	ctattttgtt	attttctaa	1680
	atacattcaa	atatgtatcc	gctcata	caataaccct	gataaaatgt	tcaataataat	1740
	tgaaaaagga	agagtatgt	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	cttttttgc	1800
	gcattttggc	ttccctgttt	tgctcacc	gaaacgcgtt	tgaaagtaaa	agatgctgaa	1860
	gatcagttgg	gtgcacgact	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	1920

5	gagagtttc gccccgaaga acgtttcca atgatgagca cttttaagt tctgtatgt ggcgcgttat tatccgtat tgacgccgg caagagcaac tcggtcgccc catacactat 2040 tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttc ggtatggatg 2100 acagtaagag aattatgcag tgctggccata accatgagtg ataacaacttc ggccaactta 2160 cttctgacaa cgatcgagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgaccaa catggggat 2220 catgtactc gccttgcgtc ttgggaaccg gagctaatg aagccatacc aaacgacgag 2280 cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aacttgcgaa 2340 ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcggta taaagttgca 2400 ggaccactc tgcgctcgcc cttccggct ggctgggttata ttgctgatata atctggagcc 2460 ggtgagcgtg ggtctcgccg tattcatgca gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 2520 atcgttagtt ttcatacagac ggggagtcag gcaactatgg cagaccaatg ttactcatat 2580 gctgagatag gtgcctact gattaagcat tgtaactgt cagaccaatg ttactcatat 2640 atactttaga ttgatttaaa acttcattt taattttaaa ggtatcttagt gaagatcctt 2700 tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgatgtt ctgtccactg agcgtcagac 2760 cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccctttt ttctgcgcgt aatctgctc 2820 ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggta tgccgatca agagcttacca 2880 actctttttc cgaaggttaac tggcttcagc agagccgaga taccacaaatc tgttttctca 2940 gtttagccgt agttaggcca cacttcaag aactctgttag caccgcctac atacctgc 3000 ctgctaattc ttgttaccatg ggctgtccg aytggcgata atcgtgtt taccgggttgc 3060 gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcgctgg gctgaacggg gggttcgtgc 3120 acacagcccc gcttggagcg aacgacctac accgaactgaa gatacctaca gcgtgagctt 3180 tgagaaagcg ccacgcttcc cgaaggggaga aaggccgaca ggtatccggta aagccggagg 3240 gtcggaaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 3300 ctctgcgggt ttccgcacact ctgacttgcg cgtcgatttt tttgtatgtc gtcagggggg 3360 cggagccata gggaaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac gtttctgcgc cttttctgtgg 3420 ccttttgc tcatgttctt tcctgcgttta cccctgtattt cttgtgatataa cctgtattacc 3480 gccttgagt gagctgatatac cgctcggccg agccgaacgaa cccagcgcac cggactgttgc 3540 agcgaggaag cggaaagagcg cccaataacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt 3600 cattaatgca gctggcacga cagggttccc gactggaaag cgggcagtga ggcacacgc 3660 attaatgtga gttagctcac tcatttagca ccccaaggctt tacactttat gcttccggct 3720 cgtatgttgc gtggaaattgt gaggcgataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat 3780 gattacgaat tccccatgcctt cggagcgtt tttcatggac ttggatataat gggtstatat 3840 atatggaaagg ttccaggaag acaaaaggttc tagaaacttc oaaaaaaaaat ccaaaatata 3900 ttttggaaaga aataccctct tgggttggcc cccggcgcagc ccctagtggtt cccaaagggcc 3960 acgatctaatt cccggctctaa ttggtctaatt agtttagact tctaatttgc ggggtcttta 4020 tgccggctcta attggctctaa ttagattaaa atccctaattt aatatgaacg caactaggct 4080 tccccctctct ctatgtttctt cggagctt tttcatggac ttggatatttgc tggccgatca 4140 ctacttcggg acttcggat atttcagat gcacatctac ttggatatttgc tggccgatctt 4200 tcatctcgga gaaattctca cagttggag gtataaccag ttggcaatttgc tggccgatctt 4260 cactcacagc caggatcagc ccatgtccca aggcaaccctt ttggatatttgc tggccgatctt 4320 tgactacttg gggctcgcgc ccctgcattt ttgcattgttc ttggatatttgc tggccgatctt 4380 agagaaatag attactaaat atcaccctt tcgttatttgc ttggatatttgc tggccgatctt 4440 gtataccgaa aaatgttatt taaaactgtgg taggtggagaa agatcttataaaaactc 4500 tacgtatact cccccctccc aatccccatc caggttgta agacacttgc gtcttttttt 4560 ggcgaattttt aaccgttaattt ttgacttagta aaaataatggt atactgtatgc taataaaat 4620 cgtacattcg gatgttggag acaggggagag gctggctggat ggcgtggatg gatcacggtc 4680 agaaagtctg acttgcacgc ccacaggccc gttgattggcc actgacaaacc aagtttctgt 4740 tgtttcgctg gtgcattatttccatc ttccgcgtatc gaatatttgc actgcgagga gaaaggcaag 4800 caggggccca tatcagacttgc ttgatcaactca ctgatcgatc agtagtagcc accttctctg 4860 cgccgcacgtt ttatattata ttggcaacaa gtcatcgatc gagaacgaaa acaaaacaag 4920 aagagaacta ttggagagag attagttac ccgcacgcgag tagccctccca ttctgcacga 4980 tcatgccata cgataaaaccg gccggcggcc agaccatgtt gcaagggttgc aatggcaaca 5040 catgtcgcc tcatttctcg gcttttcat tttgcattgtc gtcatgcagg ccctggacac 5100 tgacatttct ctcttttgc gttgaatgaa gaccctaacc tttcaccatc agcacgcccc 5160 tcaacttgc aaggcttagac gaaacccata tgcatgatgc atgagaatg gtgtgcacga 5220 atattatgaa cccgtttcca agagcaatac tccatgtgaa tacacctctt ccttgcacgt 5280 gttctgtgtt cccatttcca tagcagccgg cagtggctt gactctgact gccacgcag 5340 taatataatct ttaataacttgc cgtctgcctt cttcgtgtt ccatttgcaatc atgcacgc 5400 tgacgacatg ccatgcata gcttaatttag ctccatgcatt ccactgtctt cattaatccc 5460 ctatataaaag gactccatat gcctcaccat tcactcatcc accacagctt agcagcagca 5520 acaaccagtg ccatagacac tctccatcaa caaactcttagt ctgatcaatc ttagctaaagc 5580 ttattacata gcaaggcccc 5598
---	---

65 <210> 36  
<211> 12776  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

70 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant  
expression vector pLO114OXoBI-1

<400> 36

aattcactgg	ccgtcgaaaa	acaacgactc	agagcttgcac	aggaggccccg	atctagtaac	60	
atagatgaca	ccgcgcgcga	taatttatcc	tagtttgcgc	gctatatttt	gttttctatc	120	
5	gcgttataaa	tgttaatttgc	cgggactctca	atcataaaaaa	cccacatctat	180	
atgcattaca	tgttaatttgc	tacatgctta	acgtaatttca	acagaaaattt	tatgataatc	240	
atcgcagagc	ccggcaacagg	attcaatctt	aagaaaacttt	attgccaaat	gtttgaacga	300	
10	tcgggatca	tccgggtctg	tggcgggaaac	tccacgaaaa	tatccgaacg	cagcaagatc	360
tagagcttgg	gtccccgctca	gaagaactcg	tcaagaaggc	gatagaaggc	gatgcgcgtc	420	
gaatcgggag	ccggcataacc	gtaaaggcacg	aggaaggcggt	cagcccatcc	gcccggcaagc	480	
15	tcttcagcaa	tatcacgggt	agccaacgc	atgtctctgt	agcggccgc	cacacccaggc	540
cggccacagt	cgatgaatcc	agaaaagcg	ccatTTTCA	ccatgatatt	cggcaagcag	600	
gcatacgccat	gggtcacgac	gagatcctcg	ccgtcgccgg	tgccgcctt	gagcctggcg	660	
20	aacagttcg	ctggcgccag	ccccctatcg	tcttcgttca	gatcatccctg	atcgacaaga	720
ccggcttcca	tccgagtagc	tgctcgctcg	atgcgtatgtt	tcgcttgggt	gtcgaatggg	780	
caggtagccg	gatcaagcgt	atgcagccgc	cgcattgtat	cagccatgtat	ggatacttcc	840	
tcggcaggag	caaggtgaga	tgacaggaga	tcctgccccg	gcacttcg	caatagcagc	900	
cagttccctc	ccgcttcagt	gacaacgtcg	agcacaatcg	cgcaaggaaac	gcccgtcg	960	
25	gccagccacg	atagccgc	tgccctgtcc	tgcgttcat	tcagggcacc	ggacaggctc	1020
gtcttgacaa	aaagaacccg	gcccggctcg	gctgacagcc	ggaacacggc	ggcatcagag	1080	
cagccatttgc	tctgttgtc	ccagtcata	ccgaatagcc	tctccaccca	agcggccgg	1140	
gaacctgcgt	gcaatccatc	ttgttcaatc	atgcgaaacg	atccagatcc	gttgcaagatt	1200	
atttggatttgc	agagtgaata	tgagactcta	atggatacc	gaggggaattt	tatggaaacgt	1260	
cagttggagca	tttttgacaa	gaaatatttg	ctagctgata	gtgacccctt	gcgacttttgc	1320	
aacgcgcata	aatggtttgc	gacgtatgtt	cttagctcat	taaactccag	aaacccgg	1380	
25	ctgagtggttgc	ccttcaacat	tgcggttctg	tcagttccaa	acgtaaaacg	gtttgtcccg	1440
cgtcatcgcc	gggggtcata	acgtgactcc	cttaatttcc	cgctcatgtat	cagattgtcg	1500	
tttccggcttgc	tcagttttaaa	ctatccatgt	ttgacaggat	cctgcttgg	aataattgtc	1560	
attagattgt	ttttatgtat	agatgcactc	gaaatcagcc	aatttttagac	aagtatcaaa	1620	
25	cggatgtttaa	ttcagtcata	taaagacgtc	cgcaatgtgt	tattaagtgc	tctaagcg	1680
30	aattttgttta	caccacaata	tatccgttca	ccaggccagcc	aacagctcccc	cgaccggcag	1740
ctcggcacaat	aatccaccc	cggttaccacc	acggccggcc	gcccgtatgt	gttgaccgt	1800	
tttccggca	tttccggat	cgagcggtcc	ctaatcatcg	accgcaccc	gagcggggc	1860	
gaggccgcca	aggccggagg	cgtgaagttt	ggcccccggcc	ctacccttcac	ccggcaca	1920	
atcgccgcacg	cccgcgagct	gatcgaccag	gaaggccgca	ccgtgaaaga	ggcggctg	1980	
35	ctgcttggcg	tgcatcgctc	gaccctgtac	cgcgcaactt	agcgcagcga	ggaagtgc	2040
cccaccggagg	ccaggcgccg	cggtgccttc	cgtgaggacg	cattgcggca	ggccgacg	2100	
ctggcgcccg	ccgagaatga	acggccaaag	gaacaagcat	gaaaccgcac	caggacggcc	2160	
aggacgaaacc	gtttttcattt	accgaagagg	tcgaggccga	gatgtcg	gcccgggtac	2220	
40	tgttcgagcc	gcccgcgcac	gtctcaaccg	tgccgtctca	tgaatccctg	gcccgtt	2280
ctgatgcca	gttggcgcc	tggccggcca	gttggccgc	tgaagaaacc	gagcgc	2340	
gtctaaaaag	gtgatgtgt	ttttagttaaa	acagcttgc	tcatgcgg	gtcgctata	2400	
tgatgcgtat	agtaaataaa	caaatacgc	aggggaacgc	atgaagggtt	tcgctgtact	2460	
taaccagaaa	ggcgggttc	gcaagacgc	catcgcaacc	catctagccc	gegeccctg	2520	
actcgccggg	ggcgatgtt	tgttagtgc	ttccgatccc	caggccgt	cccgcgattt	2580	
45	ggccggccgt	cgggaaagatc	aacggctaac	cggtgtccgc	atcgaccg	cgacgattt	2640
cccgacgtg	aaggccatcg	gccccggcga	tttcgtatgt	atcgacgg	cgccccaggc	2700	
ggccgacttg	gctgtgtcc	cgatcaaggc	agccgactt	gtgtgttcc	cggtgcag	2760	
aagcccttac	gacatatggg	ccaccggccga	cctgggtgg	ctgtttaa	agcgcattt	2820	
50	ggtcacggat	ggaaggctac	aaggccgtt	tgtgtgtcg	cgggcgatca	aaggcaecgc	2880
catcgccgtt	gagggttccg	aggcgcttgc	cggttacg	ctggccatcc	ttgagttcc	2940	
tatcacgc	cgcgttgcgt	accaggac	tcggccccc	ggcacaca	ttcttgaatc	3000	
agaacccgg	ggcgacgtt	cccgccggat	ccaggcgct	gcccgtgaaa	ttaaatcaaa	3060	
actatttgc	gttaatgagg	taaagagaaa	atgagcaaaa	gcacaaaacac	gctaagtgc	3120	
55	ggccgtccga	gcmcacgc	cagaaggct	gcaacgttgg	ccagccctgg	agacacgc	3180
gcacatgaa	gggtcaactt	tcaatgttgc	cggttacg	acaccaatgc	gaagatgtac	3240	
gcmcgtaccc	aaggcaagac	cattaccgg	ctgtatct	aatacatcg	gcagctacca	3300	
gagtaatgt	gcaaatgaat	aatatgtat	atgaatittt	cgccgtttaa	gaggcgc	3360	
55	ggaaatataa	gaaacaccag	gcaccgcac	ctgttgcatt	cccatgtgt	gaggaacggg	3420
60	cggttggcca	ggcgttaagcg	gttgggttgc	ctggccggcc	tgaatggca	ctggaaaccc	3480
caagccccgg	gaatcggt	gagcggtc	aaaccatcc	gcccgttaca	aatcgccgc	3540	
gcmcgtgg	atgaccttgc	ggagaagttt	aaggccgc	aggccgc	gcccgcac	3600	
atcgaggcg	aagcaccgc	cggtgtatcg	tggcaacgc	ccgttgcatt	aatccgc	3660	
65	gaatccccgg	accggccggc	accgggtgc	cggtgtatgc	ggaaggccgc	caaggccgc	3720
gagcaaccag	attttttgc	tccgtatgc	tatgacgttgc	gacccgcga	tagtcgc	3780	
atcatggac	tggccgtttt	ccgttgc	aagcgttgc	gacgagcttgc	cgagggttgc	3840	
cgctacgc	ttccagacgg	gcacgtatgc	gttccgc	ggccggccgg	catggccat	3900	
gtgtgggatt	acgaccttgc	actgtatggc	gttccatc	taaccgaatc	catgaaccga	3960	
taccgggaa	ggaaggggaga	caagccccgg	cggtgttcc	gtccacacgt	tgcggacgt	4020	
70	ctcaagtttgc	ggccggccgc	cgatggcg	aaggcggaa	acgacccgt	4080	
atccgtttaa	acaccacgc	cggttccat	cagcgtatgc	agaaggccaa	gacccgcgc	4140	
ctggtgcacgg	tatccgggg	tgaagcccttgc	attagccgt	acaagatcg	aaagagcgaa	4200	
accggccggc	cgagatc	cgagatcg	ctagctgatt	ggtgttcc	cgagatcaca	4260	
gaaggcaaga	acccggacgt	gctgacgtt	caccccgatt	actttttgat	cgatccccgc	4320	

atcggccgtt ttctctaccc cctggcacgc cgcgcccag gcaaggcaga agccagatgg 4380  
 ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcgccggag agttcaagaa gttctgttcc 4440  
 accgtgcgca agctgatccg gtcaaattgac ctgcccggagt acgatttggaa ggaggaggcg 4500  
 5 gggcaggctg gccccatctt agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc 4560  
 gccggttcc aatgtacccg gcagatgcta gggcaaattt ccctagcagg ggaaaaaagggt 4620  
 cgaaaaggtc tcttcttgt ggatagcacc tacatggga aaaaaaggcc gtagatgggg 4680  
 aaccggaaacc cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattt ggaaccggc acacatgtaa 4740  
 gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgat ttttccgcct aaaactctt aaaaacttatt 4800  
 10 aaaactctta aaacccgcct ggcctgtca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag 4860  
 ctgcaaaaag cgcctaccct tcggtcgctg cgctccctac gccccgccc ttcgcgtcgg 4920  
 cctatcgccg cgcgtggccg ctcaaaaatg gctggccctac ggccaggca gtcgttcc 4980  
 cgcgacaag cgcgcggcgc gccactcgac cgccggccgccc cacatcaagg caccctgcct 5040  
 cgcgcgttcc ggtgatgacg gtggaaaccc ctgacacatg cagctccccc agacgggtcac 5100  
 15 agcttgtctg taageggatg ccgggagcag aacaaggccgt caggggcgcg cagcgggtgt 5160  
 tggccgggtgt cggggcgcag ccatgaccca gtcacgtac gatacgggag tgtatactgg 5220  
 cttaactatg cggcatcaga gcagattgtt ctgagagtg accatatgcg gtgtgaata 5280  
 cccgcacatg gctgttaaggag aaaataccgc atcagggcgt cttccgcctt ctcgctcact 5340  
 gactcgctgc gctcggtctg tcggctgcgg cgacgggtat cagctcactt aaaggccggt 5400  
 atacggttat ccacagaatc agggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaaggccag 5460  
 20 caaaaaggca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgtggcg ttttccatag gtcgttccccc 5520  
 cctgacgagc atcacaaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaaccc gacaggacta 5580  
 taaagatacc aggctttcc ccctggaaagc tccctcggtc gctctcctgt tccgaccctg 5640  
 cccgttaccg gataacctgtc cgcctttctc ctttggggaa gcgtggcgct ttctcatagc 5700  
 tcacgctgtt ggtatctcag ttctgtgttag gtcgttccgt ccaagctggg ctgtgtgcac 5760  
 25 gaacccccc ttcagcccg cgcgtgcgc ttcgttcc actatcgctc tgagtccaa 5820  
 cccgttaagac acgacttata gccactggca cgacccactg gtaacaggat tagcagagcg 5880  
 aggtatgtag gccgtgtac aggttcttgc aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga 5940  
 aggacagtat ttgttatctg cgctctgtcg aagccagttt ccttggaaa aagagttgt 6000  
 30 agctttgtat cccgcaaaa aaccaccgtt ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag 6060  
 cagattacgc gcagaaaaaaa aggatctaa gaagatcctt tgatcttcc tacggggtct 6120  
 gacgctcagt ggaacaaaaa ctcacgttta gggatttttg tcatgcattga tatatctccc 6180  
 aatttgtta gggcttattt tgacacgttta aaaataataa aagcagactt gacctgtatag 6240  
 tttgctgtt gcaattatgt tgcttagtgc atctaacgtt tgagtttgcg cgcgcgcgca 6300  
 35 agcggcgtcg gcttgaacca atttcttagt agacattttt tgccgactac ttgggtgatc 6360  
 tcgccttca cgtagtggac aaattcttcc aactgatctg cgccgcgggca caagcgatct 6420  
 tctttctgtc caagataaagc ctgtctagct tcaagttatg cgggctgata ctggccggc 6480  
 aggccgtcca ttggccagtc ggcacgcgaca tccttcggcg cgattttggc gttactgcg 6540  
 ctgttacaaa tgggggacaa cgttaagactt acatcttgcgt catcgccagc ccagtcggc 6600  
 40 ggcgagtttcc atagctttaa gtttccattt agcgttccaa atagatcttgc ttccaggaacc 6660  
 ggatcaaaga gttccctccgc cgctggaccc accaaggccaa cgctatgtc tcttgctttt 6720  
 gtcagcaaga tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatag 6780  
 tcattgcgtt gccattctcc aaatttgcgtt tgcgtttag ctggataacg ccacggaaatg 6840  
 atgtcgtcgat gcaacaaatc ggtgacttct acagcgcggg gaatctcgct ctctccagg 6900  
 45 gaaggccaaatg ttccaaaaag gtcgttgcattt aaagctcgcc gctgttgc tcaagatcg 6960  
 acggtcaccg ttaaccggaa atcaatatca ctgtgtggct tcggccgc atccactgcg 7020  
 gagccgtaca aatgtacggc cagcaacgtc ggttccgagat ggcgttcgt gacgccaact 7080  
 acctctgata gttgagtcga tacttcggcg atcaccgctt ccccccattgt gtttaactt 7140  
 gttttagggc gactgcccgt ctgcgttaaca tcgttgcgtc tccataacat caaacatcga 7200  
 50 cccacggcgt aacgcgttcc ctgcttggat gcccggggca tagactgtac cccaaaaaaa 7260  
 cagtcataac aaggccatgaa aaccggccact gccccgggttc catggacata caaatggacg 7320  
 aacggataaa ccttttcacg ccctttttaa tatccgatta ttcttataaaa cgctctttt 7380  
 tcttaggttt acccgccat aatccctgtc aaacactgtat ttttttttttt gttttttttt 7440  
 aacgacaatc agatcttagt gggaaacagct atgaccatgtt ttacgccaag cttgcattgc 7500  
 tgcaggtcga ctcttagagga tcgtatccccg ggttaggtcag tcccttatgt tacgttcc 7560  
 55 agaaaacccca acccggtgaaa tcaaaaaactt cgacggccgt tgggcattca gtcgttcc 7620  
 cggaaaactgt ggaattggtc agcgttgggt ggaaaggccg ttacaagaaaa gccgggcaat 7680  
 tgctgtgcctt ggcgttccat acgtatcgat ccggccatgtca gatattcgta attatgcggg 7740  
 caacgtctgg tatcagcgcg agttttttt accggaaagggt tggggcggcc agcgtatcg 7800  
 gctgcgttcc gatgcgttca ctcattacgg caaagtgtgg gtcaataatc aggaagtgt 7860  
 60 ggagcatcag ggcggctata cgccatttga agccgtatgc acgcgtatg ttattggccg 7920  
 gaaaagtgtt cgttaagttt tcgttcttacc tttgatatat atataataat tatcattat 7980  
 tagtagtaat ataattatcc aaatattttt ttcaaaaataa aagaatgtat tatatagcaa 8040  
 ttgtcttctt gtatgttata agtgtgtata tttaattttttaaactttttt aatatatgac 8100  
 65 caaaaattttt gtatgtgcag gtatcccggt ttgtgtgaa aacgaaactgta actggcagac 8160  
 tatccgcgcg ggaatgggttca ttaccgacga aaacggcaag aaaaaggactt cttacttcca 8220  
 tgatttctt aactatgcgc gaatccatcg cagcgtaatg ctctacacca cgccgaacac 8280  
 ctgggtggac gatatcaccg tgggtacgc tgcgtgcgaa gactgttacc acgcgtctgt 8340  
 tgactggcag gtgggtggccca atgggtatgt cagcgttgcgaa ctgcgtatgc cggatcaaca 8400  
 70 ggtgggttgcg actggacaaag gcactagcgg gacttgcgaa gtgggtgaaatc cgcacactt 8460  
 gcaaccgggtt gaaagggttcc tctatgtact gtcgttcaca gccaaaaaggcc agacagatgt 8520  
 tgatattctac cccgttccgcg tggcgttcccg gtcatggca gtgaaggccg aacagtctt 8580  
 gattaaccac aaaccgttctt acttactgg ttgggtgttcatgaagatg cggacttgcg 8640  
 tggcaaagga ttcgataacg tgctgtatggt gcacgaccac gcatataatgg actggattgg 8700

	ggccaactcc taccgtaccc	cgcattaccc	ttacgctgaa	gagatgctcg	actggcaga	8760
	tgaacatggc atcgtggta	ttgatgaaac	tgctgctgc	ggcttaacc	tctttagg	8820
	cattggttc gaagcggca	acaagccaa	agaactgtac	agcgaagagg	cagtcaacgg	8880
5	ggaaactcag caagcgcact	tacaggcgat	taaagagctg	atagccgtg	acaaaacca	8940
	cccaagcgtg gtgatgtgga	gtattgcaa	cgaaccggat	acccgtccgc	aagggtcactg	9000
	ggaatatttc ggcgcactgg	cggaaagcaac	gctaaactc	gaccgcacgc	gtccgatcac	9060
	ctgcgtcaat gtaatgttct	gctgacgctca	caccgatacc	atcagcgtc	tctttatgt	9120
	gctgtgcctg aaccgttatt	acggatggta	tgtccaaagc	ggcatttgg	aaacggcaga	9180
10	gaaggactg aaaaaagaac	ttctggctg	gcaggagaaa	ctgcatcgc	cgattatcat	9240
	caccgaataac ggcgtggata	cgttagccgg	gtgcacta	atgtacaccg	acatgtggag	9300
	tgaagagtat cagtgtgcat	ggctggatata	gtatcaccgc	gtcttgatc	gcgtcagcgc	9360
	cgtcgtcggt gaacaggat	ggaatttcgc	cgattttgcg	acctcgcaag	gcataattgcg	9420
	cgttggcggt aacaagaaag	ggatcttac	tcgcgaccgc	aaaccgaagt	cggcggctt	9480
15	tctgtgccaa aaacgctgaa	ctggcatgaa	cttcggtaa	aaaccgcgc	agggaggca	9540
	acaatgagag ctcgaaattt	cccgcattgt	caaaccattt	gcaataaagn	ttcttaagat	9600
	tgaatctgt tgccggctt	gctgatgat	tcataataat	tctttgaat	tacgttaagc	9660
	atgtataataa taacatgtaa	tgcatgacgt	tattttatgt	atgggtttt	atgattagag	9720
	tcccgcaatt atacatttaa	tacgcgatag	aaaacaaaat	atancgcgc	aactaggata	9780
20	aattatcgcg cgccgggtgtca	tctatgttac	tagatggga	attcccatgc	ctcgagcaga	9840
	aagatataat atgtaaaaaaa	atgggtctat	atatatggaa	ggtttcagga	agacaaaaggt	9900
	tctagaaaact tccaaaaaaaa	atccagaata	tattttggaa	gaaataccct	cttgggttgg	9960
	ccccggcgc gccccctatgt	ggccaaaaaa	ccacgatcta	atcccggtct	aattggctca	10020
	atagtttaga ctctcaatgt	gacgggtctt	tatgccgtc	taattggct	aatttagatta	10080
25	aaatccataat taaaatgaa	cgcaattttgt	cttcccttct	ctctgtttt	ctcggagctc	10140
	tttttcatgg accttgaagt	attggcgat	cactacttgc	gaactcggtt	ataactcaga	10200
	gtgcacatct actttgaatc	ttgattggta	gatcatctcg	gagaaattct	cacagttggg	10260
	aggtataacc agttggcgaa	attggcatgc	ttcactcaca	gccaggatca	ccccatgtcc	10320
	caaggcaacc cttgttagcta	catggcgagg	cctgactact	tggggcctcg	ccccctgcatt	10380
30	tttttgcattgt tcattgtgaca	cgttaatgt	tgagagaaaat	agattactaa	atataccca	10440
	tttcgattt ctatgtgat	atccataat	atgtataccg	aaaaatgtat	ttttaactgt	10500
	ggtaggtgag aaagatctat	taaaaaagaac	tctacgtata	ctccccctct	ccaatcccc	10560
	tccaggtttt taagacactt	tcgtctttt	ttgccgatt	ttaaccgtaa	atttgactag	10620
	taaaaaataag ttatactgaa	tgtaataaaat	atcgtacatt	cggatgttgg	agacagggag	10680
35	aggctggctg gtgcgctgga	tggatcacgg	tcagaaagtc	tgacttgcaa	cggccacaggg	10740
	ccgttgattt ccactgacaa	ccaagttttc	gttgtttcgc	tggtgcccata	tttccgcga	10800
	tgcataattt aaactgcgag	gagaaaggca	agcaggggcgc	catacgca	tttgatcaact	10860
	cactgatcga tcagtagat	ccaccccttc	tgcgcgcacg	tgttatataat	tattggcaac	10920
	aagtcatcga ttgagaacac	aaacaaaaca	agaagagaac	tatttgagag	agagtagtta	10980
40	cgccgcagcg agtgcattttc	catttctgac	gatcatgcca	tacgataaac	cggccggcgg	11040
	cgagaccagt tagcaaggtt	gaaatgccaa	cacatgtcgc	gtctattttt	cggtttttc	11100
	attttgcattgt tcgtcatgca	ggccctggac	actgacattt	ctctctttt	ctgttgaatg	11160
	aagacctaa cttttcacca	tcagcacgc	cctcaacttgc	ataagcctag	acgaaaccca	11220
	tatgcattatgt tgatgatgtt	tgggtgcac	aatattatgt	aaccgtttc	caagagcaat	11280
45	actccattgt aataccatcc	gtatcaccc	ctccctgtat	ctgttgcgttgc	catagcagcc	11340
	ggcagtggcc ttgactctga	ctgcacgc	agtaatataat	ctttaataaaa	ctcgctgcct	11400
	tgcttcgtgt gtccatttgc	aaatgcattgc	agtgacgaca	tgcacatgca	tagcttaatt	11460
	agctccatgc atccactgt	tccattaatc	ccctatataa	aggactccat	atgcctcacc	11520
	attcactcat ccaccacacg	ttagcagcag	caacaaccag	tgccatagac	actctccatc	11580
50	aacaaactt agctgatcaa	tcctagat	gtttattata	tagcaagccc	ggggatcttc	11640
	tagatcgac ctgcaggcg	ccgcaactgt	gattaggatt	ccaaacgcgag	ccaggacaag	11700
	cgaggAACCT tgcgtgcgag	gcgaggccgc	cccgcctccga	ttcgattcga	cgcgcaggcg	11760
	caggcgcagg gatggacggc	ttctactcg	cctcgctggc	ggcggcgagc	ggctggggcc	11820
	acgactccct caagaacttc	cgccagatct	ccccgcctgt	gcagtccac	ctcaagctcg	11880
55	tttacctgac tctatgtttt	gcactggct	catctgcgt	gggtgcttac	ctacacattt	11940
	ccctgaacat cggcggtat	ctgacaatgc	tcgcttgcgt	cggaactatc	gcctggatgt	12000
	tctcggtgc agtctatgt	gagggaaaga	ggttttggct	gtctgtgggt	gcacccctcc	12060
	tggaaaggggc ttccgttgg	cctctgttgc	acgttgcatt	agacttttgc	ccaagcatcc	12120
	tcgtgacagg gtttgcgca	accggccatcg	cctttgggt	cttctctggc	ggccccatca	12180
60	tcgccaaggcg cagggagttac	ctgtaccc	gtggcctgt	ctctgttgc	ctgtcgatcc	12240
	tgctctggct gcagtttgc	acgttccatct	ttggccactc	ctctggcagc	ttcatgtttt	12300
	aggtttactt tggccctgtt	atcttctgg	ggtacatgtt	gtacgacacg	caggagatca	12360
	tcgagaggcgc gcaccatggc	gacatggact	acatcaagca	cgccttcacc	ctcttcaccc	12420
	acttttgtc cgtccctcg	cgagtcctca	tcatcatgt	caagaacgc	ggcgacaaat	12480
65	cgaggaccaa gaagaagagg	aagagggggt	cctgaacgtw	tctccgcac	atgtagatac	12540
	cgtcaccgcg tcgacctgca	ggcatgcccc	ctgaaatcac	cagtctct	ctacaaatct	12600
	atctctctca taataatgtt	tgagtagttc	ccagataagg	gaatttaggt	tcttataagg	12660
	tttcgctcat gtgttgcgca	tataagaaac	ccttagatgt	tatttgtatt	tgtaaaataac	12720
	ttctatcaat aaaatttcta	attccataaaa	ccaaaatcca	gtgggttacgg	agctcg	12776

<213> *Triticum aestivum*

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(741)  
<223> coding for TaBI-1

<400> 37

```

10 atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg gcg gcg agc ggc tgg ggc 48
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
    1           5           10          15

```

15 tac gac tcc ctc aag aac ttc cgc gag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc 96  
 Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser  
           20                 25                 30

```

cac ctc aag ctc gtt tac ctg acc cta tgc ttt gcc ctg gcc tca tct 144
His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
35          40          45

```

20 gcc gtg ggt gct tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg 192  
Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu  
50 55 60

25 aca atg ctc gcg tgt gtt gga acc atc gcc tgg atg ttc tct gtg cca 240  
 Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro  
 65 70 75 80

30 gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc 288  
 Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu  
                   85                 90                 95

35 ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt 336  
 Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe  
           100          105          110

ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg 432  
 Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Thr Leu

45            130            135            140  
**45** tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg 480  
Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu

55	gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg tac gac	576
	Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp	
	180 185 190	

acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cac ggc gac atg gat tac atc 624  
 Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile  
 195 200 205

```

aag cac gcg ctc acc ctc ttc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc gtc cgc 672
Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
 210          215          220

```

65 gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag 720  
 Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys  
 225 230 235 240

70 aag aag agg aag agg ggg tcc tga 744  
Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser  
245

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 247

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Triticum aestivum

5

&lt;400&gt; 38

Met	Asp	Ala	Phe	Tyr	Ser	Thr	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Trp	Gly
1					5				10					15	

10

Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Asn	Phe	Arg	Glu	Ile	Ser	Pro	Ala	Val	Gln	Ser
					20			25					30		

His	Leu	Lys	Leu	Val	Tyr	Leu	Thr	Leu	Cys	Phe	Ala	Leu	Ala	Ser	Ser
					35			40					45		

15

Ala	Val	Gly	Ala	Tyr	Leu	His	Ile	Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Gly	Met	Leu
					50			55					60		

20

Thr	Met	Leu	Ala	Cys	Val	Gly	Thr	Ile	Ala	Trp	Met	Phe	Ser	Val	Pro
	65				70				75					80	

Val	Tyr	Glu	Glu	Arg	Lys	Arg	Phe	Gly	Leu	Leu	Met	Gly	Ala	Ala	Leu
					85				90					95	

25

Leu	Glu	Gly	Ala	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ile	Glu	Leu	Ala	Ile	Asp	Phe
					100				105				110		

Asp	Pro	Ser	Ile	Leu	Val	Thr	Gly	Phe	Val	Gly	Thr	Ala	Ile	Ala	Phe
						115		120				125			

30

Gly	Cys	Phe	Ser	Gly	Ala	Ala	Ile	Ile	Ala	Lys	Arg	Arg	Glu	Tyr	Leu
					130		135				140				

35

Tyr	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	Trp	Leu
	145				150				155					160	

Gln	Phe	Ala	Thr	Ser	Ile	Phe	Gly	His	Ser	Ser	Gly	Ser	Phe	Met	Phe
					165				170				175		

40

Glu	Val	Tyr	Phe	Gly	Leu	Leu	Ile	Phe	Leu	Gly	Tyr	Met	Val	Tyr	Asp
					180			185					190		

Thr	Gln	Glu	Ile	Ile	Glu	Arg	Ala	His	His	Gly	Asp	Met	Asp	Tyr	Ile
					195		200				205				

45

Lys	His	Ala	Leu	Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Leu	Val	Arg
					210		215				220				

50

Val	Leu	Ile	Ile	Met	Leu	Lys	Asn	Ala	Gly	Asp	Lys	Ser	Glu	Asp	Lys
					225		230			235				240	

Lys	Lys	Arg	Lys	Arg	Gly	Ser
					245	

55

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 1293

&lt;212&gt; DNA

60 &lt;213&gt; Hordeum vulgare

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (173)...(1126)

65 <223> coding for Hordeum vulgare subsp. vulgare syntaxin  
(Ror2)

&lt;400&gt; 39

gttaactaacc	ccttcttcct	cccttgtcca	ctccgcttct	ccccatccaa	gaaacagcgc	60
caacagctcc	acccatcgag	gagaatcaag	aaaccgcgcc	ggcgtggta	tcaaggacat	120
ccatcgatcg	atcgaccgac	cctgccttgc	ctgagtcaac	ccggcggcag	cc atg aac	178

		Met Asn	
		1	
5	aac ctc ttc tcg agc tcg tgg aag cgg ggc ggc ggg ggc gac ggg Asn Leu Phe Ser Ser Ser Trp Lys Arg Ala Gly Ala Gly Gly Asp Gly 5 10 15		226
10	gac ctg gag tcg ggc ggc ggc gtg gag atg acg gcg ccg ccg ggc Asp Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Glu Met Thr Ala Pro Pro Gly 20 25 30		274
15	gcc gcg gcg ggg gcg agc ctg gac cgc ttc ttc gag gac gtg gag tcg Ala Ala Ala Gly Ala Ser Leu Asp Arg Phe Phe Glu Asp Val Glu Ser 35 40 45 50		322
20	atc aag gac gac ctg cgg gag ctg gag cgg atc cag cgc tcc ctc cac Ile Lys Asp Asp Leu Arg Glu Leu Arg Ile Gln Arg Ser Leu His 55 60 65		370
25	gac ggc aac gag tcg ggc aag tcg ctc cac gac gcg tcg gcg gtg cgc Asp Gly Asn Glu Ser Gly Lys Ser Leu His Asp Ala Ser Ala Val Arg 70 75 80		418
30	gcg ctc cgc tcc cgc atg gac gcc gac gtg gcc gcc gcc atc aag aag Ala Leu Arg Ser Arg Met Asp Ala Asp Val Ala Ala Ala Ile Lys Lys 85 90 95		466
35	gcc aag gtg gtg aag ttg cgg ctc gag tcg ctc gac cgc gcc aac gcc Ala Lys Val Val Lys Leu Arg Leu Glu Ser Leu Asp Arg Ala Asn Ala 100 105 110		514
40	gcc aac cgg tcc gtg gcc ggg tgc ggg cgg ggg tcg tcc acg gac cgc Ala Asn Arg Ser Val Ala Gly Cys Gly Pro Gly Ser Ser Thr Asp Arg 115 120 125 130		562
45	acc cgc acc tcc gtc gtg gcc ggg ctg cgc aag aag ctg cgg gat gcc Thr Arg Thr Ser Val Val Ala Gly Leu Arg Lys Lys Leu Arg Asp Ala 135 140 145		610
50	atg gag tcc ttc tcc ctc cgc tcc cgc atc acc tcc gag tac cgg Met Glu Ser Phe Ser Ser Leu Arg Ser Arg Ile Thr Ser Glu Tyr Arg 150 155 160		658
55	gaa acc gtg gcc cgc tac ttc acg gtg acg ggg tcc cag ccc gac Glu Thr Val Ala Arg Arg Tyr Phe Thr Val Thr Gly Ser Gln Pro Asp 165 170 175		706
60	gag gcc acg ctg gac acg ctg gcg gag acg ggg gag ggg gag cgg ctc Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Gly Glu Gly Glu Arg Leu 180 185 190		754
65	ctg cag cgc gcc atc gcg gag cag cag ggg aga ggg gag gtg ctg ggc Leu Gln Arg Ala Ile Ala Glu Gln Gln Gly Arg Gly Glu Val Leu Gly 195 200 205 210		802
70	gtg gtg gcg gag atc cag gag cgg cac ggc gcc gtg gcg gac ctg gag Val Val Ala Glu Ile Gln Glu Arg His Gly Ala Val Ala Asp Leu Glu 215 220 225		850
75	cgg tcc ctg ctg gag ctg cag cag gtg ttc aac gac atg gcc gtg ctg Arg Ser Leu Leu Glu Leu Gln Gln Val Phe Asn Asp Met Ala Val Leu 230 235 240		898
80	gtg gcg gcg cag ggg gag cag ctg gac gac atc gag ggc cac gtc ggg Val Ala Ala Gln Gly Glu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Gly His Val Gly 245 250 255		946
85	cgg gcg agg tcg ttc gtc gac cgc ggg cgc gag cag ctg cag gtg gca Arg Ala Arg Ser Phe Val Asp Arg Gly Arg Glu Gln Leu Gln Val Ala 260 265 270		994
90	cgc aag cac cag aag agc tcc cgc aag tgg acc ttc atc ggc atc ggc Arg Lys His Gln Lys Ser Arg Lys Trp Thr Phe Ile Gly Ile Gly		1042

275	280	285	290
atc ctg ctc gtc gtc atc ctc atc atc gtc atc ccc atc gtg ctc aag 1090 Ile Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Ile Val Ile Pro Ile Val Leu Lys			
5	295	300	305
aac acc aac aag agc aac aac aac agc cag cag tagtggtagg 1136 Asn Thr Asn Lys Ser Asn Asn Asn Ser Gln Gln			
10	310	315	
aacaggctgt ggatctgttg tctgtctctg atgatcctgg tcctggattg cttcctgggt 1196 gttgggtttt attgtctttt gtgaaatttt ttgcgattgt aattactcca tccatgtgg 1256			
15	tcggtgagcc actcgattat tatttcatga ctatata 1293		
<210> 40			
<211> 318			
20	<212> PRT		
<213> Hordeum vulgare			
<400> 40			
25	Met Asn Asn Leu Phe Ser Ser Ser Trp Lys Arg Ala Gly Ala Gly Gly 1 5 10 15		
Asp Gly Asp Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Glu Met Thr Ala Pro 20 25 30			
30	Pro Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ser Leu Asp Arg Phe Phe Glu Asp Val 35 40 45		
Glu Ser Ile Lys Asp Asp Leu Arg Glu Leu Glu Arg Ile Gln Arg Ser 50 55 60			
35	Leu His Asp Gly Asn Glu Ser Gly Lys Ser Leu His Asp Ala Ser Ala 65 70 75 80		
40	Val Arg Ala Leu Arg Ser Arg Met Asp Ala Asp Val Ala Ala Ile 85 90 95		
Lys Lys Ala Lys Val Val Lys Leu Arg Leu Glu Ser Leu Asp Arg Ala 100 105 110			
45	Asn Ala Ala Asn Arg Ser Val Ala Gly Cys Gly Pro Gly Ser Ser Thr 115 120 125		
Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Val Ala Gly Leu Arg Lys Lys Leu Arg 130 135 140			
50	Asp Ala Met Glu Ser Phe Ser Ser Leu Arg Ser Arg Ile Thr Ser Glu 145 150 155 160		
55	Tyr Arg Glu Thr Val Ala Arg Arg Tyr Phe Thr Val Thr Gly Ser Gln 165 170 175		
Pro Asp Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Gly Glu Gly Glu 180 185 190			
60	Arg Leu Leu Gln Arg Ala Ile Ala Glu Gln Gln Gly Arg Gly Glu Val 195 200 205		
Leu Gly Val Val Ala Glu Ile Gln Glu Arg His Gly Ala Val Ala Asp 210 215 220			
65	Leu Glu Arg Ser Leu Leu Glu Leu Gln Gln Val Phe Asn Asp Met Ala 225 230 235 240		
70	Val Leu Val Ala Ala Gln Gly Glu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Gly His 245 250 255		
Val Gly Arg Ala Arg Ser Phe Val Asp Arg Gly Arg Glu Gln Leu Gln 260 265 270			

Val Ala Arg Lys His Gln Lys Ser Ser Arg Lys Trp Thr Phe Ile Gly  
 275 280 285  
 5 Ile Gly Ile Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Ile Val Ile Pro Ile Val  
 290 295 300  
 10 Leu Lys Asn Thr Asn Lys Ser Asn Asn Asn Asn Ser Gln Gln  
 305 310 315  
 15 <210> 41  
 <211> 948  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(945)  
 <223> coding for Arabidopsis thaliana syntaxin 121  
 (SYP121) / syntaxin-related protein (SYR1)  
 (At3g11820)  
 25 <400> 41  
 atg gcg aat ccc gcg gga tca acc ggt ggt gtg aac ctc gac aag ttc  
 Met Ala Asn Pro Ala Gly Ser Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp Lys Phe  
 1 5 10 15  
 30 ttc gaa gat gtt gaa tct gtg aaa gaa gag cta aag gag cta gat cgg  
 Phe Glu Asp Val Glu Ser Val Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Asp Arg  
 20 25 30  
 35 ctc aac gaa aca ctc tct tca tgt cac gag cag agc aag acg ctt cac  
 Leu Asn Glu Thr Leu Ser Ser Cys His Glu Gln Ser Lys Thr Leu His  
 35 40 45  
 40 aat gct aaa gcc gtt aaa gat ctc cgg tct aaa atg gac ggt gac gtt  
 Asn Ala Lys Ala Val Lys Asp Leu Arg Ser Lys Met Asp Gly Asp Val  
 50 55 60  
 45 gga gtc gcg ttg aag aag gcg aag atg att aaa gtt aaa ctc gag gcg  
 Gly Val Ala Leu Lys Ala Lys Met Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala  
 65 70 75 80  
 50 cta gat cgt gcc aat gct gct aat cgg agt ctc cct ggc tgg gga cct  
 Leu Asp Arg Ala Asn Ala Asn Arg Ser Leu Pro Gly Cys Gly Pro  
 85 90 95  
 55 ggt tct tcc tcc gat cga acc agg acc tct gtc ctc aat ggt ctc agg  
 Gly Ser Ser Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Leu Asn Gly Leu Arg  
 100 105 110  
 60 aag aaa ttg atg gac tct atg gat agt ttc aac cga ttg agg gag ctt  
 Lys Lys Leu Met Asp Ser Met Asp Ser Phe Asn Arg Leu Arg Glu Leu  
 115 120 125  
 65 atc tcg tcc gag tat aga gaa act gta cag agg agg tac ttc acc gtc  
 Ile Ser Ser Glu Tyr Arg Glu Thr Val Gln Arg Arg Tyr Phe Thr Val  
 130 135 140  
 70 acc ggc gag aat ccg gat gaa cga acc cta gat cga ctg att tcc act  
 Thr Gly Glu Asn Pro Asp Glu Arg Thr Leu Asp Arg Leu Ile Ser Thr  
 145 150 155 160  
 75 gga gag agt gag aga ttc ttg cag aaa gca ata caa gaa caa gga aga  
 Gly Glu Ser Glu Arg Phe Leu Gln Lys Ala Ile Gln Glu Gln Gly Arg  
 165 170 175  
 80 gga agg gtg tta gac acc att aac gag att caa gaa agg cat gat gcg  
 Gly Arg Val Leu Asp Thr Ile Asn Glu Ile Gln Glu Arg His Asp Ala  
 180 185 190

	gtt aaa gac att gag aag aat ctc agg gag ctt cac cag gtg ttt cta	624
	Val Lys Asp Ile Glu Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Gln Val Phe Leu	
	195 200 205	
5	gac atg gcc gtg ctg gta gag cac cag gga gct cag ctt gat gac atc	672
	Asp Met Ala Val Leu Val Glu His Gln Gly Ala Gln Leu Asp Asp Ile	
	210 215 220	
10	gag agt cat gtg ggt cga gct agc tcc ttt atc aga ggc gga act gac	720
	Glu Ser His Val Gly Arg Ala Ser Ser Phe Ile Arg Gly Gly Thr Asp	
	225 230 235 240	
15	cag cta caa acc gct cgg gtt tac cag aag aac acg cga aaa tgg aca	768
	Gln Leu Gln Thr Ala Arg Val Tyr Gln Lys Asn Thr Arg Lys Trp Thr	
	245 250 255	
20	tgt att gcc att att att ctc atc atc atc ata act gtt gtg gtt ctt	816
	Cys Ile Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Thr Val Val Val Leu	
	260 265 270	
	gct gtt tta aaa ccg tgg aac aac agc agt ggc ggc ggc ggc ggt ggt	864
	Ala Val Leu Lys Pro Trp Asn Asn Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly	
	275 280 285	
25	ggt ggt ggg ggt acc act gga gga agt caa cca aat tca ggg aca cca	912
	Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ser Gln Pro Asn Ser Gly Thr Pro	
	290 295 300	
30	cca aat cct cct cag gca agg cgt cta ttg cgt tga	948
	Pro Asn Pro Pro Gln Ala Arg Arg Leu Leu Arg	
	305 310 315	
35	<210> 42 <211> 315 <212> PRT <213> Arabidopsis thaliana	
40	<400> 42 Met Ala Asn Pro Ala Gly Ser Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp Lys Phe	
	1 5 10 15	
	Phe Glu Asp Val Glu Ser Val Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Asp Arg	
	20 25 30	
45	Leu Asn Glu Thr Leu Ser Ser Cys His Glu Gln Ser Lys Thr Leu His	
	35 40 45	
50	Asn Ala Lys Ala Val Lys Asp Leu Arg Ser Lys Met Asp Gly Asp Val	
	50 55 60	
	Gly Val Ala Leu Lys Lys Ala Lys Met Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala	
	65 70 75 80	
55	Leu Asp Arg Ala Asn Ala Ala Asn Arg Ser Leu Pro Gly Cys Gly Pro	
	85 90 95	
	Gly Ser Ser Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Leu Asn Gly Leu Arg	
60	100 105 110	
	Lys Lys Leu Met Asp Ser Met Asp Ser Phe Asn Arg Leu Arg Glu Leu	
	115 120 125	
65	Ile Ser Ser Glu Tyr Arg Glu Thr Val Gln Arg Arg Tyr Phe Thr Val	
	130 135 140	
	Thr Gly Glu Asn Pro Asp Glu Arg Thr Leu Asp Arg Leu Ile Ser Thr	
	145 150 155 160	
70	Gly Glu Ser Glu Arg Phe Leu Gln Lys Ala Ile Gln Glu Gln Gly Arg	
	165 170 175	
	Gly Arg Val Leu Asp Thr Ile Asn Glu Ile Gln Glu Arg His Asp Ala	

40

	180	185	190
	Val Lys Asp Ile Glu Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Gln Val Phe Leu		
5	195	200	205
	Asp Met Ala Val Leu Val Glu His Gln Gly Ala Gln Leu Asp Asp Ile		
	210	215	220
10	Glu Ser His Val Gly Arg Ala Ser Ser Phe Ile Arg Gly Gly Thr Asp		
	225	230	235
	Gln Leu Gln Thr Ala Arg Val Tyr Gln Lys Asn Thr Arg Lys Trp Thr		
	245	250	255
15	Cys Ile Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Thr Val Val Val Leu		
	260	265	270
	Ala Val Leu Lys Pro Trp Asn Asn Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly		
20	275	280	285
	Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ser Gln Pro Asn Ser Gly Thr Pro		
	290	295	300
25	Pro Asn Pro Pro Gln Ala Arg Arg Leu Leu Arg		
	305	310	315

30	<210> 43		
	<211> 1275		
	<212> DNA		
	<213> Hordeum vulgare		
35	<220>		
	<221> CDS		
	<222> (80)..(1006)		
	<223> coding for Hordeum vulgare subsp. vulgare SNAP-34		
40	<400> 43		
	ggcccccctcca cccccacccca cccagtcgct gcggatactt gattctgcta ctcgccac 60		
	gatcgatctc gcctccgccc atg agc gcc acc agg ccc tcc ttc ttc ccc tcc 112		
	Met Ser Ala Thr Arg Pro Ser Phe Phe Pro Ser 1 5 10		
45	aac aac aac agg aac aag ccc gcc acc cgg aac ccc ttc gac tcc gac 160		
	Asn Asn Asn Arg Asn Lys Pro Ala Thr Arg Asn Pro Phe Asp Ser Asp 15 20 25		
50	tgc gac gac gac ggc atg gcc cgg cgc ggc ccg gcg cgg gcc tcg 208		
	Ser Asp Asp Asp Gly Gly Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Arg Ala Ser 30 35 40		
55	tcc gtc ccg acc ccc gcc gcg ggg ccg gcc agg gcc tcc tcg gcc ccg 256		
	Ser Val Pro Thr Pro Ala Ala Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Ala Pro 45 50 55		
60	atc ccc gcc gac gag gcg gac cag cgg ggc gcc ctg ttc ggc gcg ggc 304		
	Ile Pro Ala Asp Glu Ala Asp Gln Arg Gly Ala Leu Phe Gly Ala Gly 60 65 70 75		
65	ccc gcg ccg tcc ggc ttc gcg tcc tcc tcc gcg gcc gcc agg ggc 352		
	Pro Ala Pro Ser Gly Phe Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ala Arg Gly 80 85 90		
70	cgg tac agg aac gac ttc cgc gac tcg ggc ggc gtg gag gcg cag tcc 400		
	Arg Tyr Arg Asn Asp Phe Arg Asp Ser Gly Gly Val Glu Ala Gln Ser 95 100 105		
	gtg cag gag ctc gag ggc tac gcg gcc tac aag gcc gag gag acc acg 448		
	Val Gln Glu Leu Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Lys Ala Glu Glu Thr Thr 110 115 120		

cgc cgg gtc gac ggc tgc ctc cgg gtc gcc gag gag atg cgg gac acc 496  
 Arg Arg Val Asp Gly Cys Leu Arg Val Ala Glu Glu Met Arg Asp Thr  
 125 130 135

5 gcg tca aag acc ctg ctc cag gtg cac cag cag ggc cag cag atc agg 544  
 Ala Ser Lys Thr Leu Leu Gln Val His Gln Gln Gly Gln Gln Ile Arg  
 140 145 150 155

10 cgc acc cac gcc atg gcc gtc gac atc gac cag gat ctc tcc agg ggg 592  
 Arg Thr His Ala Met Ala Val Asp Ile Asp Gln Asp Leu Ser Arg Gly  
 160 165 170

15 gaa aag cta cta ggt gat ctt ggt ggt ttg ttt tcc aag aag tgg aag 640  
 Glu Lys Leu Leu Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe Ser Lys Lys Trp Lys  
 175 180 185

20 cca aag aag aac ggc gca atc agg ggc cct atg ctg acc aga gac gat 688  
 Pro Lys Lys Asn Gly Ala Ile Arg Gly Pro Met Leu Thr Arg Asp Asp  
 190 195 200

25 ctg tca gat cgt ccg cat cga tcc aat gca cgc cag ttc cta tct gaa 784  
 Leu Ser Asp Arg Pro His Arg Ser Asn Ala Arg Gln Phe Leu Ser Glu  
 220 225 230 235

30 ccc aca tca ggc ctt gag aaa gtc gag gtg gag aag gca aag cag gat 832  
 Pro Thr Ser Gly Leu Glu Lys Val Glu Val Glu Lys Ala Lys Gln Asp  
 240 245 250

35 gat ggc ctg tct gac ctt agc gac ata ctg aca gag ttg aaa gga atg 880  
 Asp Gly Leu Ser Asp Leu Ser Asp Ile Leu Thr Glu Leu Lys Gly Met  
 255 260 265

40 gcc att gac atg gga act gag att gag ggg caa aca aag gat ctt ggt 928  
 Ala Ile Asp Met Gly Thr Glu Ile Glu Gly Gln Thr Lys Asp Leu Gly  
 270 275 280

45 cat gcg gag aag gac ttt gac gaa ctt aac tac agg gtc aag ggg gca 976  
 His Ala Glu Lys Asp Phe Asp Glu Leu Asn Tyr Arg Val Lys Gly Ala  
 285 290 295

50 aac gct cga aca cgt cgc ctg ctt ggc aga taggcaagaa gcataatgttg 1026  
 Asn Ala Arg Thr Arg Arg Leu Leu Gly Arg  
 300 305

55 ttcaccagag gattctgtga cactccttat cttctgcatt tgctttcggt ggctgttaat 1086  
 tcagatcatt ttgtgcataa aactctggtt aggaaggctt gttggggagt tgtatcaggg 1146  
 tttattgtgt atatacgcta gacgggcggt tcgcccccta tttgcagtt gtactacatt 1206

60 tgctatggac agtagatacg tttgtattcg gttttcttgt tttgcaatcg ctatgctgca 1266  
 ggaaagcac 1275

65 <210> 44  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Hordeum vulgare

70 <400> 44  
 Met Ser Ala Thr Arg Pro Ser Phe Phe Pro Ser Asn Asn Asn Arg Asn  
 1 5 10 15  
 Lys Pro Ala Thr Arg Asn Pro Phe Asp Ser Asp Ser Asp Asp Asp Gly  
 20 25 30

Gly Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Val Pro Thr Pro  
 35 40 45

Ala Ala Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Ala Pro Ile Pro Ala Asp Glu  
50 55 60

5 Ala Asp Gln Arg Gly Ala Leu Phe Gly Ala Gly Pro Ala Pro Ser Gly  
65 70 75 80

Phe Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ala Arg Gly Arg Tyr Arg Asn Asp  
10 85 90 95

Phe Arg Asp Ser Gly Gly Val Glu Ala Gln Ser Val Gln Glu Leu Glu  
100 105 110

Gly Tyr Ala Ala Tyr Lys Ala Glu Glu Thr Thr Arg Arg Val Asp Gly  
15 115 120 125

Cys Leu Arg Val Ala Glu Glu Met Arg Asp Thr Ala Ser Lys Thr Leu  
130 135 140

Leu Gln Val His Gln Gln Gly Gln Gln Ile Arg Arg Thr His Ala Met  
20 145 150 155 160

Ala Val Asp Ile Asp Gln Asp Leu Ser Arg Gly Glu Lys Leu Leu Gly  
25 165 170 175

Asp Leu Gly Gly Leu Phe Ser Lys Lys Trp Lys Pro Lys Lys Asn Gly  
180 185 190

Ala Ile Arg Gly Pro Met Leu Thr Arg Asp Asp Ser Phe Ile Arg Lys  
30 195 200 205

Gly Ser His Met Glu Gln Arg His Lys Leu Gly Leu Ser Asp Arg Pro  
210 215 220

His Arg Ser Asn Ala Arg Gln Phe Leu Ser Glu Pro Thr Ser Gly Leu  
35 225 230 235 240

Glu Lys Val Glu Val Glu Lys Ala Lys Gln Asp Asp Gly Leu Ser Asp  
40 245 250 255

Leu Ser Asp Ile Leu Thr Glu Leu Lys Gly Met Ala Ile Asp Met Gly  
260 265 270

Thr Glu Ile Glu Gly Gln Thr Lys Asp Leu Gly His Ala Glu Lys Asp  
45 275 280 285

Phe Asp Glu Leu Asn Tyr Arg Val Lys Gly Ala Asn Ala Arg Thr Arg  
290 295 300

50 Arg Leu Leu Gly Arg  
305

08 SEP 2005

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

54350 021006



(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. September 2004 (23.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/081217 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82, C07K 14/415, C12N 15/29, A01H 5/00

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002436

(22) Internationales Anmeldedatum:  
10. März 2004 (10.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 11 118.2 12. März 2003 (12.03.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRANK, Markus [DE/DE]; Rheindammstrasse 30, 68163 Mannheim (DE). KOGEL, Karl-Heinz [DE/DE]; Berggartenstrasse 7, 35457 Lollar (DE). HÜCKELHOVEN, Ralph [DE/DE]; Glaubrechtstr. 12, 35392 Giessen (DE).

(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. Dezember 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR INCREASING RESISTANCE AGAINST STRESS FACTORS IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER RESISTENZ GEGEN STRESSFAKTOREN IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing or increasing resistance against at least one biotic or abiotic stress factor in plants, preferably against plant pathogens, by increasing expression of at least one Bax inhibitor 1 (BI1) protein in at least one plant tissue, under the proviso that expression in leaf epidermis remains substantially unmodified. The invention relates further to recombinant expression cassettes and vectors that comprise a nucleic acid sequence coding for the BI protein under the control of a tissue-specific promoter, said promoter having substantially no activity in leaf epidermis. The invention further relates to recombinant plants that are transformed with said expression cassettes or vectors, to cultures, parts or recombinant propagation material derived thereof, and to the use of the same for producing food, feeding stuff, seeds, pharmaceuticals or fine chemicals.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Massgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BIProtein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

WO 2004/081217 A3

STK

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/002436

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N15/29 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/101079 A (PIONEER HI BRED INT) 19 December 2002 (2002-12-19) the whole document -----	1-11
A	US 2003/009785 A1 (REED JOHN C) 9 January 2003 (2003-01-09) paragraphs [0014] - [0019] -----	1-11
A	EP 0 864 650 A (DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL I) 16 September 1998 (1998-09-16) abstract -----	1-11
A	WO 00/26391 A (UNIV NEBRASKA LINCOLN ;DICKMAN MARTIN B (US)) 11 May 2000 (2000-05-11) cited in the application page 4, lines 1-10 ----- -/-	1-11

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 2004

Date of mailing of the international search report

29.09.04

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

*THIS PAGE BLANK (USPTO)*

## INTERNATIONALES FORSCHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002436

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LINCOLN JAMES E ET AL: "Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 99, Nr. 23, 12. November 2002 (2002-11-12), Seiten 15217-15221, XP002286824 November 12, 2002 ISSN: 0027-8424 (ISSN print) Zusammenfassung -----	1-11
P,A	HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to Blumeria graminis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 100, Nr. 9, 29. April 2003 (2003-04-29), Seiten 5555-5560, XP002286823 April 29, 2003 ISSN: 0027-8424 (ISSN print) Zusammenfassung -----	1-11
P,A	CHAE H-J ET AL: "Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, Bd. 323, 24. Dezember 2003 (2003-12-24), Seiten 101-113, XP004477034 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument -----	1-11

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see supplemental sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-11

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/EP2004/002436**

**Box III**

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

Invention 1:           Claims 1-11

Method for generating or increasing stress resistance in plants by increasing the protein amount or function of a Bax inhibitor-1 (BI1) protein.

Invention 2:           Claims 12-20 (in part)

Polypeptide- and polynucleotide sequences coding for BI1 protein with the sequence as per SEQ ID NO:12.

Inventions 3-12:       Claims 12-20 (in part)

As invention 2, but for BI1 protein with one of the sequences as per SEQ ID NO:14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 or 38.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002436

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 02101079	A	19-12-2002	CA EP WO US	2450669 A1 1406484 A2 02101079 A2 2003056249 A1		19-12-2002 14-04-2004 19-12-2002 20-03-2003
US 2003009785	A1	09-01-2003		KEINE		
EP 0864650	A	16-09-1998	JP JP AU AU CA CA CN CN EP JP JP US US	3331367 B2 10309142 A 703009 B2 5832398 A 2231738 A1 2375804 A1 1436845 A 1195026 A ,B 0864650 A2 2000023583 A 2002300822 A 6310272 B1 2003005480 A1		07-10-2002 24-11-1998 11-03-1999 17-09-1998 11-09-1998 11-09-1998 20-08-2003 07-10-1998 16-09-1998 25-01-2000 15-10-2002 30-10-2001 02-01-2003
WO 0026391	A	11-05-2000	AU CA CN EP JP WO	1241100 A 2348705 A1 1413257 T 1161546 A2 2002538769 T 0026391 A2		22-05-2000 11-05-2000 23-04-2003 12-12-2001 19-11-2002 11-05-2000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002436

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N15/29 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENDE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der In Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02/101079 A (PIONEER HI BRED INT) 19. Dezember 2002 (2002-12-19) das ganze Dokument	1-11
A	US 2003/009785 A1 (REED JOHN C) 9. Januar 2003 (2003-01-09) Absätze '0014! - '0019!	1-11
A	EP 0 864 650 A (DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL I) 16. September 1998 (1998-09-16) Zusammenfassung	1-11
A	WO 00/26391 A (UNIV NEBRASKA LINCOLN ; DICKMAN MARTIN B (US)) 11. Mai 2000 (2000-05-11) in der Anmeldung erwähnt Seite 4, Zeilen 1-10	1-11
	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- \*'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*'P' Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- \*& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

1. Juli 2004

29.09.04

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/002436

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LINCOLN JAMES E ET AL: "Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 99, no. 23, 12 November 2002 (2002-11-12), pages 15217-15221, XP002286824 November 12, 2002</p> <p>ISSN: 0027-8424 (ISSN print)</p> <p>abstract</p> <p>-----</p>	1-11
P,A	<p>HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to Blumeria graminis."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 100, no. 9, 29 April 2003 (2003-04-29), pages 5555-5560, XP002286823 April 29, 2003</p> <p>ISSN: 0027-8424 (ISSN print)</p> <p>abstract</p> <p>-----</p>	1-11
P,A	<p>CHAE H-J ET AL: "Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 323, 24 December 2003 (2003-12-24), pages 101-113, XP004477034</p> <p>ISSN: 0378-1119</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-11

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-11

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

Erfindung 1: Ansprüche 1-11

Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Stressresistenz in Pflanzen durch Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins

Erfindung 2: Ansprüche 12-20 (Teilweise)

Polypeptid- und Polynukleotidsequenzen kodierend für BI1 Protein mit der Sequenz gemäss SEQ ID NO: 12

Erfindung 3-12: Ansprüche 12-20 (Teilweise)

wie Erfindung 2, jedoch BI1 Protein mit einer der Sequenzen gemäss SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32, oder 38.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/002436

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 02101079	A	19-12-2002	CA	2450669 A1	19-12-2002
			EP	1406484 A2	14-04-2004
			WO	02101079 A2	19-12-2002
			US	2003056249 A1	20-03-2003
US 2003009785	A1	09-01-2003	NONE		
EP 0864650	A	16-09-1998	JP	3331367 B2	07-10-2002
			JP	10309142 A	24-11-1998
			AU	703009 B2	11-03-1999
			AU	5832398 A	17-09-1998
			CA	2231738 A1	11-09-1998
			CA	2375804 A1	11-09-1998
			CN	1436845 A	20-08-2003
			CN	1195026 A ,B	07-10-1998
			EP	0864650 A2	16-09-1998
			JP	2000023583 A	25-01-2000
			JP	2002300822 A	15-10-2002
			US	6310272 B1	30-10-2001
			US	2003005480 A1	02-01-2003
WO 0026391	A	11-05-2000	AU	1241100 A	22-05-2000
			CA	2348705 A1	11-05-2000
			CN	1413257 T	23-04-2003
			EP	1161546 A2	12-12-2001
			JP	2002538769 T	19-11-2002
			WO	0026391 A2	11-05-2000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**